

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALCALÓIDES E CUMARINAS DE *ZANTHOXYLUM CHILOPERONE*:
ISOLAMENTO E ATIVIDADE GENOTÓXICA

Dissertação apresentada por
ELIANA ELISABETH DIEHL para
obtenção do grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Porto Alegre, 1992

Dissertação apresentada e aprovada em 25 de agosto de 1992,
perante Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Ana Ligia Lia de Paula Ramos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Catalogação na fonte

D559a Diehl, Eliana Elisabeth

Alcalóides e cumarinas de **Zanthoxylum chiloperone**: isolamento e atividade genotóxica/
Eliana Elisabeth Diehl. - 146p.: il., tab.,
gráf.

Dissertação (mestrado). UFRGS: Faculdade
de Farmácia.

1. Alcalóides. 2. Cumarinas. 3. **Zanthoxylum chiloperone**. 4. Atividade genotóxica. 5. Atividade mutagênica. 6. Rutáceas. I. Henriques, Amélia T. II. Título.

CDU: 547.94

Índices para catálogo sistemático:

Zanthoxylum chiloperone: alcalóides
Zanthoxylum chiloperone: cumarinas
Alcalóides: atividade genotóxica
Cumarinas: atividade genotóxica
Rutáceas

"(...)
alguns acham que não há porta
é isto o que eles acham
não há como saber se há porta
exceto atravessando a porta"

R.D. LAING
(In: Laços)

"Um livro é como uma casa. Tem fachada, jardim, sala de visitas, quartos, dependência de empregada e até mesmo cozinha e porão. Suas páginas iniciais, como aquelas conversas cerimoniais que antigamente eram regadas a guaraná geladinho e biscoito champanhe, servem solenemente para dizer ao leitor (esse fantasma, que nos chega da rua) o que se diz normalmente a uma visita de consideração. Que não repare nós móveis, que o dono da morada é modesto e bem-intencionado, que não houve muito tempo para limpar direito a sala ou arrumar os quartos. Que vá, enfim, à vontade e desculpando alguma coisa ...

Por trás do formalismo óbvio há sempre a regra de ouro da hospitalidade, que se traduz pura e simplesmente no respeito pela pessoa da visita e na satisfação de tê-la dentro do nosso teto, querendo conversar conosco. Aliás, melhor dizendo, são precisamente essas normas de recepção que amortecem a passagem entre a casa e a rua e, simultaneamente, nos fazem anfitriões, transformando - por outro lado - o estranho, o parente e até mesmo o inimigo ou o estrangeiro numa 'visita'. (...)

Pois bem: recebo o leitor nesta casa com todos esses sentimentos. O primeiro diz, naturalmente, da hospitalidade com que espero acolher aqui quem vem procurar alguma coisa. Conversa séria ou fiada, conselho, sabedoria ou material de trabalho e pesquisa".

Roberto da Matta
(In: A Casa & a Rua)

Preferi nesta página - a dos Agradecimentos - não colocar os nomes daqueles que (com)partilharam comigo - direta ou indiretamente - da gestação e nascimento deste filho (ou filha, como preferirem). Na verdade, não consigo inserir esta gestação num tempo/espço delimitado; ela foi fruto de todo um encadeamento de vivências, e por isto precisaria de páginas e páginas para agradecer a todas as pessoas que foram/são importantes no meu processo de vida.

Humildemente, faço a reverência do meu MUITO OBRIGADO! a todos: família, fraternos amigos, guias espirituais e intelectuais e aos colegas.

Este trabalho teve a co-orientação do Prof. Dr.
JOÃO ANTONIO PEGAS HENRIQUES, Professor Titular do
Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRGS e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

A bolsa de pós-graduação foi concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ESQUEMAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
SINOPSE	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. GENERALIDADES	2
1.2. TESTES EM MICROORGANISMOS	6
1.2.1. Teste em sistema procariótico: Indução SOS e mu- tação	7
1.2.1.1. Sistema SOS: mecanismo	8
1.2.2. Teste em sistema eucariótico: levedura Saccharo- myces cerevisiae	12
1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A QUIMIOTAXONOMIA EM RUTACEAE	21
1.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO Zanthoxylum/Fagara ..	24
1.5. OBJETIVOS	25
2. EXPERIMENTAL	26
2.A. MATERIAL	27
2.1. MATERIAL VEGETAL	27
2.2. MATERIAL PARA ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA	28
2.2.1. Cromoteste SOS - Sistema procariótico	28
2.2.2. Teste de Ames (Salmonella /microsoma)	28
2.2.3. Teste de Sobrevivência em sistema eucariótico ...	29
2.2.4. Equipamentos e suas padronizações	30
2.2.5. Reagentes, Solventes, Drogas, Meios de Cultura ..	31

2.2.5. Reagentes, Solventes, Drogas, Meios de Cultura ..	31
2.2.5.1. Análise química	31
2.2.5.2. Análise biológica	32
2.2.5.2.1. Cromoteste SOS	32
2.2.5.2.2. Teste de Ames	33
2.2.5.2.3. Teste de sobrevivência em S. cerevisiae	34
2.2.6. Cromatografias	35
2.B MÉTODOS	36
2.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	36
2.4. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES E CUMARINAS	38
2.4.1. Extrato éter de petróleo das raízes	38
2.4.2. Extrato éter de petróleo das folhas	39
2.4.3. Extrato diclorometânico das raízes	39
2.4.4. Extrato de alcalóides totais das folhas	40
2.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES E CUMARINAS	41
2.5.1. Composto ZA1	41
2.5.2. Composto ZA2	42
2.5.3. Composto ZA3	42
2.5.4. Composto ZA4	43
2.5.5. Composto ZC1	44
2.5.6. Composto ZC2	44
2.5.7. Composto ZC3	45
2.6. CROMOTESTE SOS - TESTE EM SISTEMA PROCARIÓTICO	47
2.6.1. PROCEDIMENTO	47
2.6.1.1. Teste para β -galactosidase	49
2.6.1.2. Teste para fosfatase alcalina	49
2.6.1.3. Fração microssomal S9	49

2.6.2. Fator de indução	51
2.7. TESTE DE AMES - Salmonella /MICROSSOMA	52
2.7.1. Condições de crescimento	52
2.7.2. Procedimento	52
2.7.3. Interpretação e Avaliação dos Resultados	54
2.8. TESTE DE SOBREVIVÊNCIA - TESTE EM SISTEMA EUCARIÓTICO	56
2.8.1. Condições de crescimento	56
2.8.2. Curvas de sobrevivência	57
3. RESULTADOS	59
3.1. ANÁLISE QUÍMICA	60
3.1.1. Rendimento das extrações e das substâncias isoladas	60
3.1.2. Caracterização e identificação das substâncias isoladas	61
3.1.2.1. Composto ZA1	61
3.1.2.2. Composto ZA2	68
3.1.2.3. Composto ZA3	71
3.1.2.4. Composto ZA4	75
3.1.2.5. Composto ZC1	83
3.1.2.6. Composto ZC2	90
3.1.2.7. Composto ZC3	95
3.2. ANÁLISE BIOLÓGICA	103
3.2.1. Cromoteste SOS - teste de genotoxicidade em sistema procariótico	103
3.2.2. Teste de Ames - Salmonella /microsoma	106
3.2.3. Efeito citotóxico em cepas haplóides de S. cerevisiae proficientes e deficientes nas vias de reparação	111
4. DISCUSSÃO	115

5. CONCLUSÕES	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXO 1	144
ANEXO 2	145
ANEXO 3	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo para o sistema regulatório SOS	10
Figura 2 - Ciclo mitótico da levedura S. cerevisiae	14
Figura 3 - Estrutura molecular de algumas furocumarinas fotorreativas com a molécula de DNA	15
Figura 4 - Representação esquemática das fotorreações de furocumarinas mono e bifuncionais com o DNA	18
Figura 5 - Composto ZA1 - Espectro na região do infra- vermelho	63
Figura 6 - Composto ZA1 - Espectro de massas por impacto eletrônico	64
Figura 7 - Composto ZA1 - Espectro de ressonância magné- tica protônica	66
Figura 8 - Composto ZA2 - Espectro de massas por ioniza- ção química (NH ₃)	69
Figura 9 - Composto ZA2 - Espectro de ressonância magné- tica protônica	70
Figura 10 - Composto ZA3 - Espectro na região do infra- vermelho	72
Figura 11 - Composto ZA3 - Espectro de massas por impac- to eletrônico	73
Figura 12 - Composto ZA3 - Espectro de ressonância mag- nética protônica	74
Figura 13 - Composto ZA4 - Espectro na região do infra- vermelho	77
Figura 14 - Composto ZA4 - Espectro de massas por impac- to eletrônico	78
Figura 15 - Composto ZC1 - Espectro na região do infra- vermelho	84
Figura 16 - Composto ZC1 - Espectro de massas por impac- to eletrônico	85
Figura 17 - Composto ZC1 - Espectro de ressonância mag- nética protônica	87

Figura 18 - Composto ZC2 - Espectro de massas por ionização química (CH ₄)	91
Figura 19 - Composto ZC2 - Espectro de ressonância magnética protônica	92
Figura 20 - Composto ZC2 - Espectro de ressonância magnética de ¹³ C	94
Figura 21 - Composto ZC3 - Espectro na região do infravermelho	96
Figura 22 - Composto ZC3 - Espectro de massas por impacto eletrônico	97
Figura 23 - Composto ZC3 - Espectro de ressonância magnética protônica	99
Figura 24 - Composto ZC3 - Espectro de ressonância magnética de ¹³ C	100
Figura 25 - Curvas dose-resposta no Cromoteste SOS para o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona	105
Figura 26 - Teste de Ames: curva dose-efeito para a cepa TA100 de <i>S. typhimurium</i> (com pré-incubação e "S9 mix")	110
Figura 27 - Curvas de % de sobrevivência de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	113

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota biossintética dos principais metabólitos secundários de Rutaceae	23
Esquema 2 - Extração dos alcalóides totais das folhas de Zanthoxylum chiloperone	37
Esquema 3 - Composto ZA1 - Fragmentações no espectômetro de massas	65
Esquema 4 - Composto ZA4 - Fragmentações no espectômetro de massas	79
Esquema 5 - Composto ZA4 - Fragmentações no espectômetro de massas	81
Esquema 6 - Composto ZA4 - Fragmentações no espectômetro de massas	82
Esquema 7 - Composto ZC1 - Fragmentações no espectômetro de massas	89
Esquema 8 - Composto ZC3 - Fragmentações no espectômetro de massas	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos das extrações das raízes e folhas de Zanthoxylum chiloperone	60
Tabela 2 - Rendimentos em substâncias isoladas das raízes e folhas de Zanthoxylum chiloperone	61
Tabela 3 - Dados espectrais de RMN- ¹ H a 250 MHz em CDCl ₃ do composto ZA1	66
Tabela 4 - Dados espectrais de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C para o composto ZC3	101
Tabela 5 - Atividade indutora da 5-metoxicantin-6-ona sobre a função SOS, na cepa PQ37 de E. coli , no cromoteste SOS sem e com metabolização (S9 induzida com Aroclor 1254)	104
Tabela 6 - Indução de revertentes HIS⁺ em cepa de S. typhimurium TA98, em ausência de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona	107
Tabela 7 - Indução de revertentes HIS⁺ em cepa de S. typhimurium TA98, em presença de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona	107
Tabela 8 - Indução de revertentes HIS⁺ em cepa de S. typhimurium TA100, em ausência de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona	108
Tabela 9 - Indução de revertentes HIS⁺ em cepa de S. typhimurium TA100, em presença de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona	108
Tabela 10 - Indução de revertentes HIS⁺ em cepa de S. typhimurium TA100, em presença de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona (pré-incubação)	109
Tabela 11 - Percentual de sobrevivência da cepa selvagem N123 de S. cerevisiae , em fase estacionária de crescimento, após diferentes tempos de incubação com a anisocumarina H ₂ (5 x 10 ⁻⁵ M) sob radiação UV 365 nm (8 KJ.m ⁻²)	112

SINOPSE

As raízes e folhas da espécie **Zanthoxylum chiloperone** Martius ex Engler (Rutaceae) foram analisadas, visando o isolamento e identificação de alcalóides e cumarinas. As raízes forneceram os alcalóides cantin-6-ona e 5-metoxicantin-6-ona (grupo cantinona), celeritrina (grupo benzofenanthridínico) e esquimianina (grupo furoquinoleínico) e as piranocumarinas angulares trans-avicenol e trans-avicenina. A partir das folhas foram obtidos o alcalóide 5-metoxican-
tin-6-ona e a anisocumarina H.

O alcalóide 5-metoxicantin-6-ona foi analisado biologicamente quanto às suas atividades genotóxica e mutagênica em organismos procarióticos. Este alcalóide não mostrou nenhuma atividade mutagênica no teste de Ames (**Salmonella**/Microsoma), pelo método de incorporação nas cepas TA100 e TA98, em presença e ausência de metabolização. Entretanto, quando o teste foi realizado empregando-se o procedimento de pré-incubação para a cepa TA100, com ativação metabólica, a resposta mutagênica foi positiva. Em adição, 5-metoxicantin-6-ona foi capaz de induzir um efeito genotóxico quando testado pelo Cromoteste SOS. Os valores das potências indutoras SOS (SOSIP) obtidos com e sem ativação metabólica foram praticamente os mesmos. Estes resultados indicaram que este alcalóide é um agente genotóxico e mutagênico de ação direta em células procarióticas.

A anisocumarina H, tendo a dupla ligação C3-C4 disponível no núcleo cumarínico, foi avaliada quanto a sua capacidade de fotoadicionar-se ao DNA. Para tal finalidade, procurou-se detectar um possível efeito letal desta cumarina em presença de radiação UV 365 nm sobre culturas haplóides de **Saccharomyces cerevisiae** proficientes e deficientes em sistemas de reparação. O efeito letal fotoinduzido em células da cepa selvagem N123 e dos mutantes bloqueados na via de reparação por excisão-ressíntese (**rad3-2**) e recombinação (**rad52-1**), tratadas em diferentes fases de crescimento, não foi pronunciado. Estes resultados sugerem que o número reduzido de monoadições induzidas pela anisocumarina H em presença de radiação UV 365 nm foram eficientemente reparadas.

ABSTRACT

Roots and leaves of **Zanthoxylum chiloperone** Martius ex Engler (Rutaceae) were analysed concerning the isolation and identification of alkaloids and coumarins. The following alkaloids: canthin-6-one and 5-methoxycanthin-6-one (canthinone group), chelerythrine (benzo[c]phenanthridine group) and skimianine (furoquinoline group), besides the angular pyranocoumarins trans-avicennol and trans-avicennin were obtained from the roots. The leaves shown the presence of the alkaloid 5-methoxycanthin-6-one and the anisocoumarin H.

The 5-methoxycanthin-6-one was tested for the presence of genotoxic and mutagenic activities in prokaryotic organisms. This alkaloid did not show mutagenic activity in the Ames test (**Salmonella**/Microsoma system) carried out by the incorporation procedure using strains TA100 and TA98 with and without microsomal activation. However, when the test was carried out by the pre-incubation procedure, a positive mutagenic response was observed in TA100. In addition, 5-methoxycanthin-6-one was able to induce a genotoxic effect, when tested with SOS Chromotest. The SOS Induction Potency (SOSIP) values obtained with and without metabolic activation were practically the same. These results indicate that this alkaloid is a direct genotoxic and mutagenic agent in the prokaryotic cells.

The capacity of the anisocoumarin H bearing a dis-
poseable C3-C4 double bond in the coumarinic group to photo-
bind to DNA was evaluated. For this purpose, a possible
lethal effect of this coumarin in the presence of 365 nm-UV
radiation on yeast haploid **Saccharomyces cerevisiae** cultures
proficient and deficient in the repair system was searched.
The lethal effect observed after photoaddition of the
anisocoumarin H on cells of the wild type strain (N123) and
of the mutants blocked in the excision-resynthesis (**rad3-2**)
and recombinogenic (**rad52-1**) DNA repair pathway was not
pronounced. These results suggest that in this activating
wavelength 365 nm-UV the number of the monoadducts induced
by this coumarin was reduced and repaired efficiently.

1. INTRODUÇÃO

1.1. GENERALIDADES

A família Rutaceae agrupa um grande número de gêneros e espécies, de grande importância na medicina popular e como fornecedora de substâncias com interesse terapêutico/farmacológico.

Dentre os gêneros utilizados na medicina popular, destaca-se o complexo **Zanthoxylum/Fagara**, amplamente difundido em países da África. A mastigação de pedaços de raízes de **Z. zanthoxyloides** provoca sensações de formigamento, gosto picante e dormência, sendo por isto usada para tratamento de dor de dentes (SOFOWORA, 1982). Investigações sobre a atividade antimicrobiana desta espécie, demonstraram que a presença de derivados do ácido benzóico (ácido 2-hidroximetilbenzóico e ácido p-hidroxibenzóico) e os alcalóides cantin-6-ona, berberina e celeritrina conferem atividade contra a flora microbiana oral, dependente do pH (ODEBIYI & SOFOWORA, 1979).

Outras espécies são utilizadas para um grande número de indicações, como dores de estômago e abdominais,

antídoto ativo para picadas de serpentes, no tratamento de escrofulária, tumores cancerosos e lepra (SOFOWORA, 1982).

Em Honduras, **Z. culantrillo** é conhecido como "du-
erme lingua", devido à sensação de adormecimento da língua
quando se mastiga a casca ou as folhas frescas; **Z. coriaceum**
é comum nas Bahamas, onde as raízes fervidas são usadas
contra diarreia e hemorragias. Um extrato das folhas é usado
na Venezuela para dor de ouvido (SWINEHART & STERMITZ,
1980).

Entre os metabólitos com interesse terapêutico,
destaca-se o alcalóide pilocarpina, isolado de **Pilocarpus**
jaborandi; este alcalóide é um parassimpatomimético, usado
no tratamento do glaucoma. Os flavonóides, comuns na
família, como rutina, quercetina, quercetrina, ramnetina,
diosmina, diosmetina, luteolina e taxifolina, são
conhecidos por sua ação a nível de permeabilidade capilar, e
chamados por isto de vitamina P, atuando sobre problemas
circulatórios, hemorragias em diabéticos, queimaduras por
radiação, etc. (WAGNER, 1977). Furocumarinas, também pre-
sentes na família, apresentam atividade fotosensibilizante,
sendo que o bergapteno foi a primeira substância a ter esta
ação comprovada em 1916 por Freund (WAGNER, 1977). Outras
furocumarinas, como angelicina, psoraleno e seus análogos
naturais e sintéticos têm sido usadas em associação com luz
ultravioleta 320 - 400 nm (UVA) no tratamento do vitiligo,
psoríase e outras doenças de pele (BEN-HUR & SONG, 1984).

Nas últimas décadas, a detecção de substâncias antitumorais destacou os alcalóides dentre os metabólitos secundários. Vários alcalóides de núcleo benzofenantridínico, naturalmente encontrados em Rutaceae, mostraram atividade antileucêmica, anti-transcriptase reversa e inibidores de vários sistemas experimentais (para revisão ver KAKIUCHI et al., 1987). No gênero *Fagara*, podemos citar o alcalóide fagaronina (de *F. xanthoxyloides*), ativo contra leucemia P388 "in vivo" (WAGNER, 1977).

Os alcalóides, porém, por sua grande atividade biológica, não são destituídos de toxicidade. Desta forma, além da composição química e propriedades farmacológicas, os riscos toxicológicos, incluindo genotóxicos, devem ser rigorosamente analisados, visto que este grupo de substâncias é capaz de interagir com o DNA, modificando-lhe a estrutura e provocando lesões.

Alterações nos processos de regulação celular, mutações, recombinação gênica, têm sido consideradas agentes iniciadores de desorganização celular, podendo levar ao desenvolvimento do processo de carcinogênese (KINSELLA & RADMAN, 1978; ZIMMERMANN et al., 1984).

O processo de carcinogênese pode ser explicado por uma teoria que propõe que a transformação maligna ocorre em duas etapas consecutivas: iniciação e promoção. Na etapa de iniciação, admite-se que ocorra a indução de mutações somáticas em virtude da deficiência na capacidade de reparação ou reparo incorreto (reparação indutível SOS).

Tem-se observado que a potência de iniciação de certas substâncias está muito relacionada com sua ação mutagênica (KUNZ et al., 1980).

Os agentes promotores, quando administrados a animais ou células juntamente com substâncias carcinogênicas, são capazes de aumentar a frequência de transformação maligna. Admite-se que as mutações que levam à carcinogênese sejam recessivas, podendo ser expressas por eventos recombinacionais em organismos diplóides. Estes eventos são importantes na fase promocional do câncer (KINSELLA & RADMAN, 1978; KUNZ & HAYNES, 1981; FAHRIG, 1984).

Considerando-se que o DNA, provavelmente, é um dos sítios da ação terapêutica dos alcalóides, a possibilidade de algumas destas substâncias conduzirem a eventos mutagênicos e/ou carcinogênicos deve ser rigorosamente avaliada, determinando o tipo de lesões que podem ser induzidas e se são reparáveis, com o intuito de prever riscos a longo prazo, baseando-se na correlação já estabelecida entre atividades mutagênica e carcinogênica (MOUSTACCHI & FAVAUDON, 1982; MOUSTACCHI et al., 1983a; MELO et al., 1986; VON POSER, 1987; MORENO, 1989).

O emprego sistemático de testes com animais de laboratório para a determinação de atividades mutagênicas e/ou oncogênicas mostra-se em regra de difícil execução, pois além de onerosos e de necessitarem uma amostragem muito grande de animais para assegurar significância estatística aos resultados, a verificação da ocorrência de efeitos

genéticos pode exigir muitas gerações. Por estas razões, foram desenvolvidos testes com células em cultura, também designados testes rápidos, os quais são menos onerosos, fornecem resultados em prazos mais curtos e apresentam elevado índice de confiabilidade (HENRIQUES et al., 1987).

Embora seja incontestável a validade dos testes que selecionam agentes carcinogênicos em virtude de seu efeito mutagênico, é importante ressaltar que compostos genotóxicos não induzem, necessariamente, à mutagênese. Uma análise mais ampla, enfocando além de testes que medem dano mutacional também metodologias que detectam outras alterações na molécula de DNA, pode ser a base para o aumento da correlação entre dano genotóxico em microorganismos e carcinogênese em organismos superiores (ROSSMAN et al., 1984; QUILLARDET & HOFNUNG, 1988; ROSSMAN et al., 1991).

1.2. TESTES EM MICROORGANISMOS

A medida do efeito genotóxico de substâncias químicas, através de testes rápidos em microorganismos, nos distingue os compostos capazes de induzir processos carcinogênicos e avalia a atividade mutagênica, estudando o modo de ação dos agentes genotóxicos. O conhecimento destes mecanismos de interação com o DNA fornece informações sobre a natureza da alteração primária na molécula (modificação de bases, fosfatos ou açúcares, quebras de cadeia, incorporações

de bases modificadas), o tipo de mutação preferentemente induzida e a influência dos processos de reparação na atividade genotóxica (FRIEDBERG, 1985; QUILLARDET & HOFNUNG, 1988).

Recomenda-se que, para obtenção de resultados mais confiáveis, seja feito mais de um teste, utilizando sempre que possível, organismos diferentes (bactérias e leveduras) (HENRIQUES et al., 1987; PAULA-RAMOS, 1986).

1.2.1. Teste em sistema procariótico: indução SOS e mutação

Os testes em bactérias são particularmente indicados para triagem, detecção e identificação de substâncias hábeis em produzir danos ao DNA. Permitem também o estudo dos produtos de metabolização dessas substâncias e, além disso, são rápidos, seguros e pouco onerosos (DEVORET, 1980).

Como a genética bacteriana é bem conhecida, ela permitiu o desenvolvimento de muitas cepas com grande sensibilidade a uma ampla gama de agentes genotóxicos. Algumas substâncias são inativas, não apresentando ação direta sobre a célula, mas gerando metabólitos eletrofílicos. Estes são capazes de interagir com os centros nucleofílicos do DNA formando aductos (VARGAS, 1992).

O sistema de indução metabólica, usualmente associado a ensaios com organismos procarióticos, é constituído de um homogenado microssomal obtido a partir de fígado de rato, previamente tratado com agente indutor enzimático (MARON & AMES, 1983). Desta forma, torna-se possível mimetizar o metabolismo da substância em células de mamíferos. A combinação de ensaios na ausência e na presença de sistemas metabólicos e cepas bacterianas sensíveis a diferentes agentes possibilita determinar tanto substâncias com ação genotóxica direta como monitorar a atividade, positiva ou negativa, dos metabólitos gerados pela biotransformação (MARON & AMES, 1983; QUILLARDET & HOFNUNG, 1988).

1.2.1.1. Sistema SOS: mecanismo

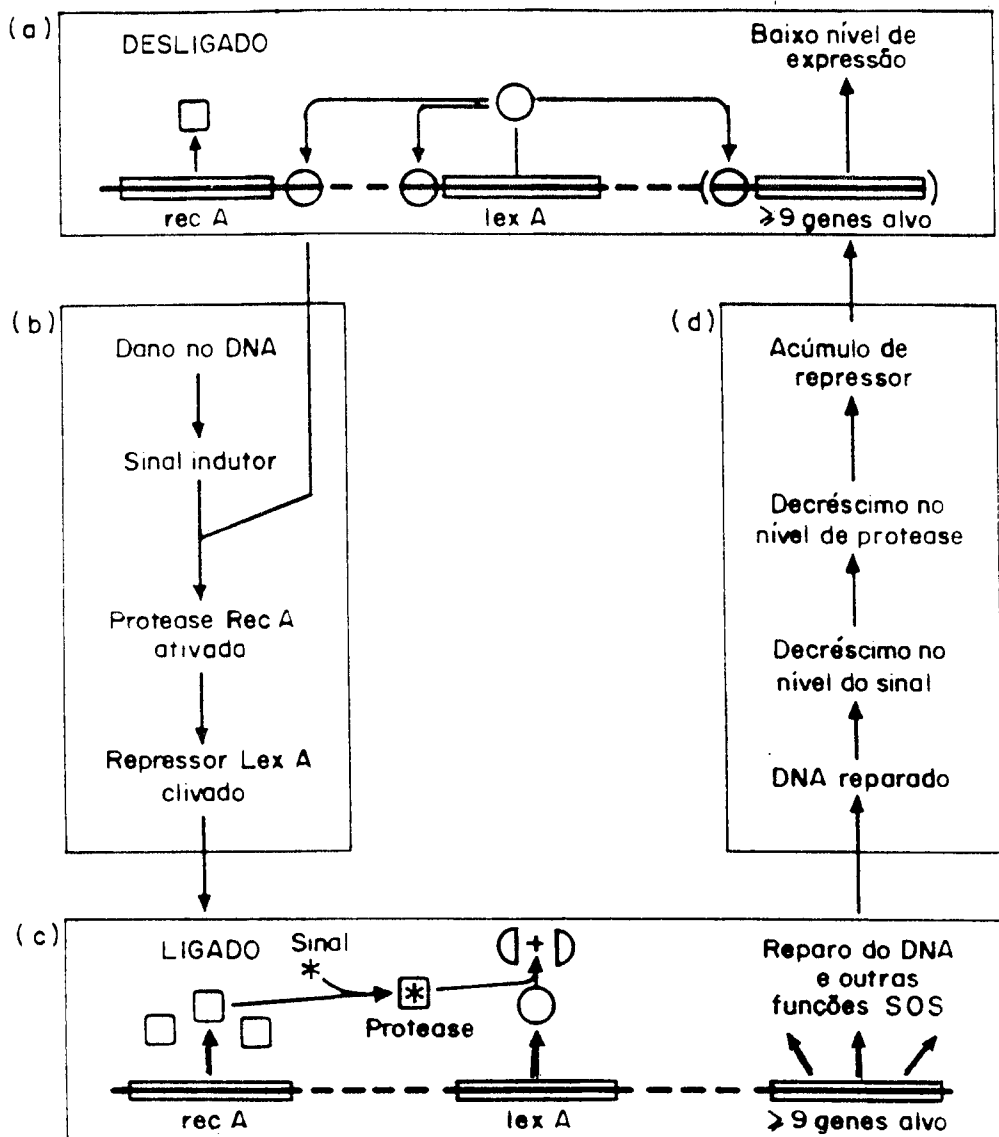
Segundo QUILLADERT & HOFNUNG (1988), quatro rotas genéticas em bactérias são capazes de responder ao "stress". Estas rotas são: o sistema adaptativo para agentes alquilantes, o sistema SOS (incluindo o dano ao código genético), o sistema que responde ao "stress" oxidativo e a resposta ao choque térmico.

O sistema SOS (para revisão ver: LITTLE & MOUNT, 1982; LITTLE, 1983; WALKER, 1984; QUILLARDET & HOFNUNG, 1988) tem sido muito estudado em virtude do grande número de agentes que atuam sobre ele. Quando as células bacterianas

são tratadas com agentes que causam danos ao DNA, tem-se uma indução das funções SOS ou funções dano-induzidas (**din**), cuja expressão é dependente da existência de alelos selvagens de dois genes, **recA** e **lexA**.

O gene **lexA** é capaz de codificar uma proteína repressora (LexA), atuante em diversos genes não ligados (pelo menos 15 são conhecidos, entre eles o próprio **lexA**), e **recA** codifica uma proteína hábil (protease RecA) para clivar (ou promover a clivagem) do produto repressor de **lexA**. Durante o crescimento exponencial (figura 1a: estado desligado), a proteína LexA reprime o conjunto de genes alvo do sistema SOS. O processo é desencadeado por ativação de um sinal SOS indutor (figura 1b). A exata natureza deste sinal permanece desconhecida. No entanto, ele é produzido quando uma lesão no DNA perturba ou bloqueia o processo de replicação semi-conservativa. Com a clivagem do repressor de **lexA** pela ação proteolítica da proteína RecA, ocorre desrepressão dos genes SOS (figura 1c: estado ligado). Quando as lesões no DNA são reparadas, decresce o sinal indutor e, conseqüentemente, a atividade da protease RecA. A proteína LexA, neste momento acumulada na célula, age reprimindo novamente os genes SOS (figura 1d). A transição entre o estado ligado e desligado é controlada pelo nível de atividade da protease RecA e a variabilidade desta ação modifica a estabilidade da protease LexA (LITTLE, 1983; VARGAS, 1992).

Entre as várias funções SOS já descritas na literatura para **Escherichia coli**, pode-se citar a reparação



(□) Proteína RecA; (○) Proteína LexA; (D) fragmento da proteína LexA após clivagem. Flexas grossas em c. denotam expressão dos genes SOS em níveis desreprimidos. Em b. o tratamento indutor é especificado como dano ao DNA, mas outros tratamentos indutores parece gerarem um sinal indutor.

Para simplicidade, só os estados extremos do sistema regulatório foram representados. No entanto, estados intermediários do sistema podem existir, nos quais o nível de proteína LexA é mais baixo que em a., e no qual alguns ou todos os genes SOS estão parcialmente desreprimidos (LITTLE, 1983).

Figura 1 - Modelo para o sistema regulatório SOS.

a. Estado do sistema com células em crescimento exponencial; b. Transição ao estado induzido; c. Estado induzido; d. Transição ao estado normal de crescimento.

incorreta ou reparo SOS (a mutagênese), a filamentação e a indução do profago λ .

Os genes controlados pelo repressor **lexA** incluem, entre outros: **umuCD**, **uvrA**, **uvrB**, **sulA**, **himA**, **recA**, **lexA**, além dos genes **mucAB** do plasmídeo pKM101. Destes genes, **umuCD** controla a mutagênese indireta verificada através do teste de Ames (mutatestes, teste Salmonella/Microsossoma), e o gene **sulA** controla a filamentação celular, cuja indução é observada através do cromoteste SOS (apud VARGAS, 1992).

O teste de Ames foi desenvolvido por AMES et al. (1971, 1973a, 1973b, 1975) e baseia-se na indução de mutações reversas em linhagens de **Salmonella typhimurium**, auxotróficas para o aminoácido histidina que conduzem as mesmas à prototrofia.

A mutação induzida por agentes genotóxicos pode produzir em bactérias dois tipos principais de lesões: modificação do pareamento de uma base -mutação passiva- **recA** independente ou perturbação e modificação do código genético -mutação ativa- SOS ou **recA** dependente. Este tipo de mutagênese que desencadeia o sistema SOS pode produzir danos tanto no sítio da lesão como em qualquer região do genoma. Muitos mutagênicos são do tipo SOS, tendo sido o teste Salmonella/microsossoma otimizado para resposta SOS. O plasmídeo pKM101, presente em algumas cepas, apresenta o gene **mucAB** alelo de **umuCD**, aumentando a sensibilidade à mutagênese SOS. As principais linhagens utilizadas em testes de triagem são: TA100, a qual mede a presença de danos por substituição de pares de

bases; TA98, que identifica substâncias que lesam o DNA por erro no quadro de leitura; e TA102, a qual possui um par de bases AT no sítio crítico para reversão, detectando uma variedade de substâncias oxidativas, formas ativas de oxigênio e agentes alquilantes, possuindo sistema de reparo por excisão intacto (LEVIN et al., 1982; MARON & AMES, 1983; VARGAS, 1992).

No cromoteste SOS, desenvolvido por QUILLARDET et al. (1982a e b), a expressão de genes SOS é monitorada diretamente pelos níveis de β -galactosidase em linhagens de *Escherichia coli*, com fusão do operon **sulA::lacZ**. Esta fusão coloca o gene estrutural para β -galactosidase, **lacZ** sob controle de **sulA**, gene envolvido na inibição da divisão celular que causa filamentação (QUILLARDET et al., 1985; QUILLARDET & HOFNUNG, 1985).

1.2.2. Teste em sistema eucariótico: levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *S. cerevisiae* tem sido muito utilizada em testes rápidos para avaliação dos processos de reparação do DNA. Ela é um fungo unicelular e uninuclear, do tipo Ascomicete, apresentando um sistema genético versátil e bem caracterizado, com ciclo mitótico definido em cepas haplóides, diplóides e poliplóides, tendo por isto vantagens sobre

os sistemas procarióticos e sobre os complexos sistemas de eucariotos superiores.

A figura 2 mostra o seu ciclo mitótico, onde observa-se a fase estacionária G1, caracterizada por um grande número de células sem brotos (cerca de 98% das células), com seu DNA não replicado. A fase exponencial, correspondente a S e G2 do ciclo celular, tem um número elevado de células em brotamento (cerca de 20 - 30%), cujos brotos podem ser pequenos, do tamanho de 3/4 da célula mãe e em duplas, com o DNA já replicado ou em vias de replicação.

Considerando o exposto acima, juntamente com o conhecimento da capacidade de fotossensibilização de furocumarinas (psoraleno e seus derivados - figura 3) e sua consequente utilização na terapêutica médica em combinação com luz UVA (referido como tratamento PUVA), testes com levedura *S. cerevisiae* vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos para estudar e avaliar a possível ação genotóxica destas substâncias (para revisão ver AVERBECK, 1989).

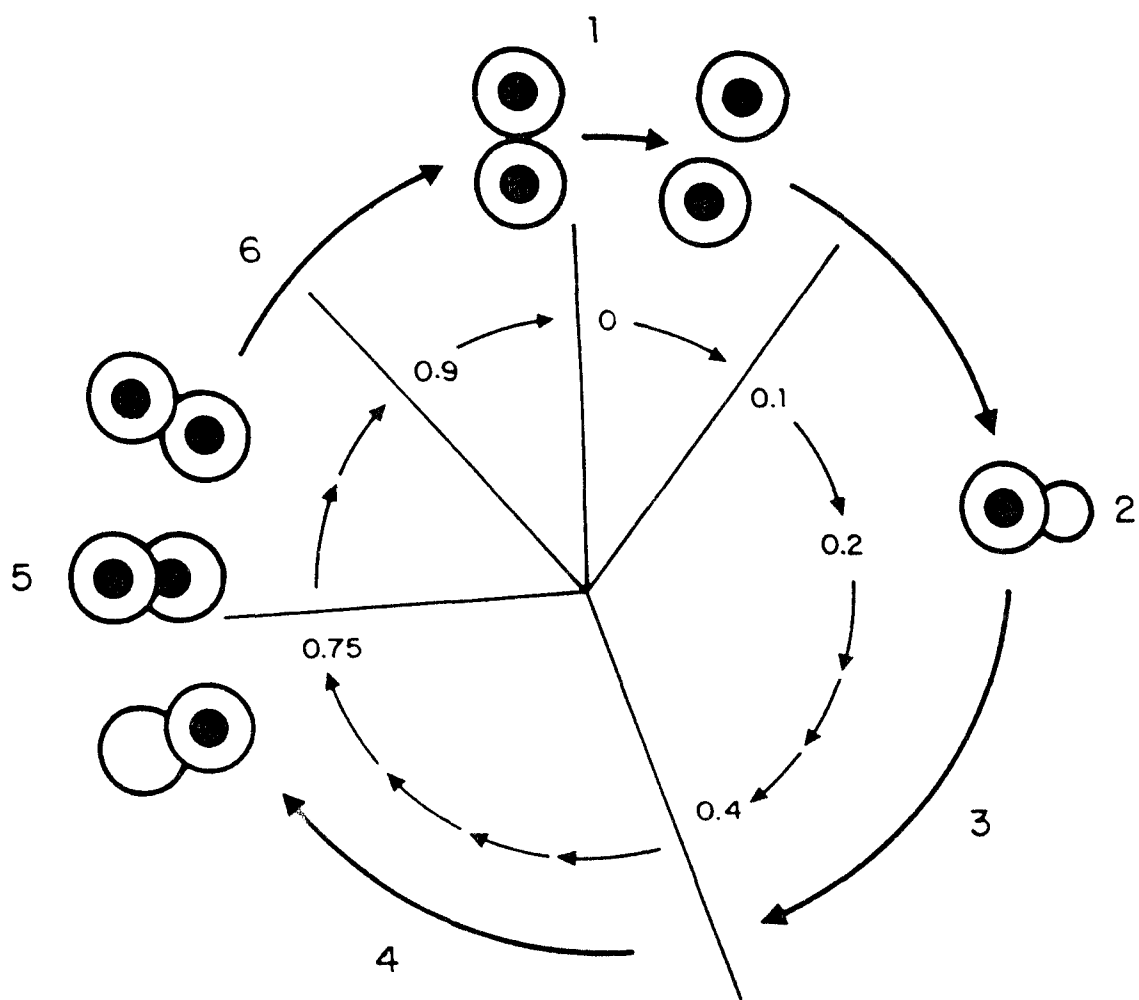


Figura 2 - Ciclo mitótico da levedura *S. cerevisiae* (HARTWELL, 1970).

1. Fase G1: divisão celular
 2. Início do brotamento
 3. Fase S: síntese do DNA nuclear
 4. Fase G2
 5. Divisão nuclear
 6. Citocinese
- } Fase G1

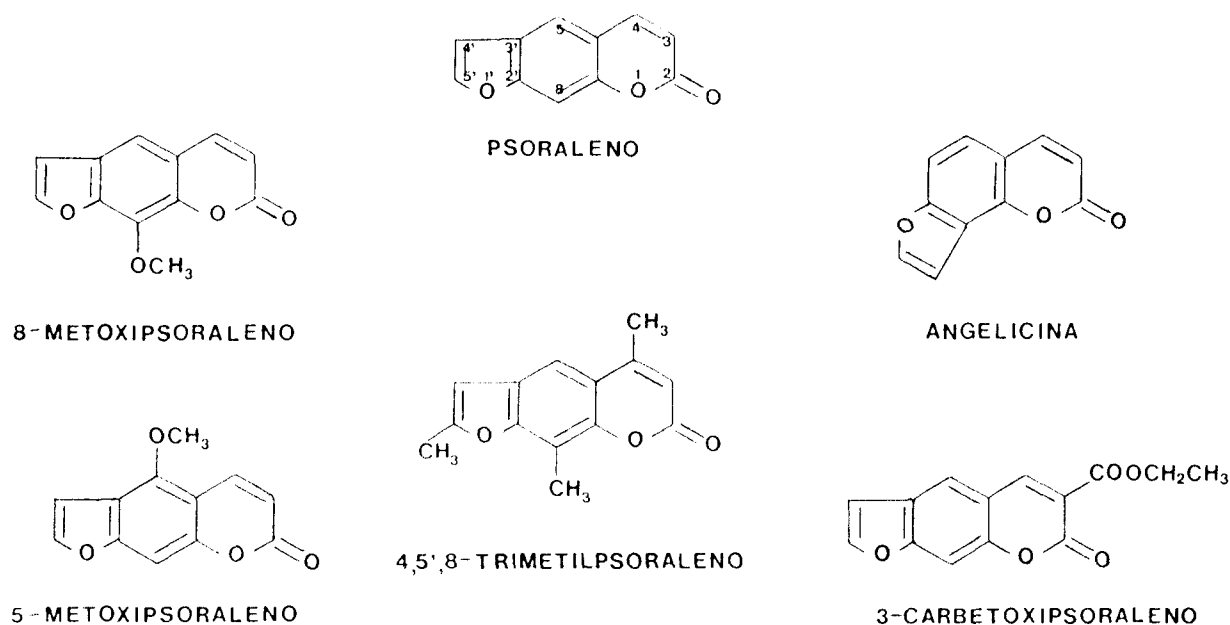


Figura 3 - Estrutura molecular de algumas furocumarinas fotorreativas com a molécula de DNA.

Um dos primeiros trabalhos que avaliou os efeitos da adição de uma furocumarina (8-metoxipsoraleno - 8-MOP) na presença de luz ultravioleta 320 - 400 nm sobre um microorganismo (bactéria) foi realizado em 1959, cujos resultados mostraram que a letalidade celular dependia da concentração da droga e da fluência da luz UVA (apud BEN-HUR & SONG, 1984).

O isolamento e a síntese de novos análogos do psoraleno têm possibilitado a elucidação mais detalhada do mecanismo de ação das fotorreações com os ácidos nucleicos na

presença de luz UVA, bem como a detecção e caracterização dos aductos de DNA formados "in vivo" e "in vitro", a análise da reatividade com outras macromoléculas (lipídeos e proteínas) e componentes celulares como membrana, e o envolvimento do oxigênio nestas reações (AVERBECK, 1989).

Estes agentes fotossensibilizadores podem produzir diversos efeitos celulares, tais como letalidade, mutação, recombinação, aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs, bem como tumores em mamíferos (para revisão ver SONG & TAPLEY, 1979; PARSONS, 1980; AVERBECK, 1982, 1988 e 1989).

Ao contrário de outros agentes carcinogênicos, os psoralenos não requerem modificações químicas, isto é, ativação microssomal, para produzir efeitos letais ou mutagênicos. Porém, necessitam de radiação ultravioleta para interagirem com o DNA (SONG & TAPLEY, 1979). Sob o efeito de luz UVA, eles reagem de maneira covalente com as bases pirimídicas, levando à formação de monoadições cíclicas (figura 4a). Estas monoadições podem ser de dois tipos:

1. Monoadições 3,4 - resultantes da ligação covalente entre a dupla ligação C5-C6 da base pirimídica (timina) com a dupla ligação C3-C4 do núcleo cumarínico;
2. Monoadições 4',5' - resultante da ligação covalente entre a dupla ligação C5-C6 da timina com a dupla ligação C4'-C5' do anel furano.

As monoadições do tipo 3,4 são incapazes de absorver novos fótons de comprimento de onda de 365 nm. Entretanto, monoadições 4',5' podem absorver um segundo fóton de 365 nm e reagir com outra base pirimídica localizada na cadeia oposta de DNA, originando biadições (pontes intercadeias no DNA) (figura 4b) (CASSIER et al., 1984). As furocumarinas capazes de produzir monoadições e pontes no DNA são conhecidas como bifuncionais, como por exemplo, o 8-MOP, 5-MOP e 4,5',8-tri-metilpsoraleno (TMP). Aquelas que são produtoras somente de monoadições são ditas monofuncionais, como o 3-carbetoxipso-raleno (3-CPs) e a angelicina (figura 3).

A proporção de monoadições em relação às pontes varia em função da estrutura da furocumarina e da dose de radiação de 365 nm utilizada, sendo o número de monoadições maior que o número de biadições (DALL'ACQUA, 1977; SONG & TAPLEY, 1979; AVERBECK, 1985). De um modo geral, os compostos bifuncionais são mais eficientes na indução de recombinação e mutação, bem como apresentam maior letalidade do que os compostos monofuncionais (AVERBECK et al., 1978; AVERBECK & MOUSTACCHI, 1980; AVERBECK, 1982).

A resposta ao longo do ciclo celular quanto à mutagenicidade, à recombino gênese e ao efeito letal, levou ao isolamento de mutantes sensíveis a agentes genotóxicos físicos e/ou químicos, como por exemplo os mutantes rad (sensíveis às radiações ultravioleta e X) (KUNZ & HAYNES, 1981) e pso (sensíveis à fotoadição de furocumarinas)

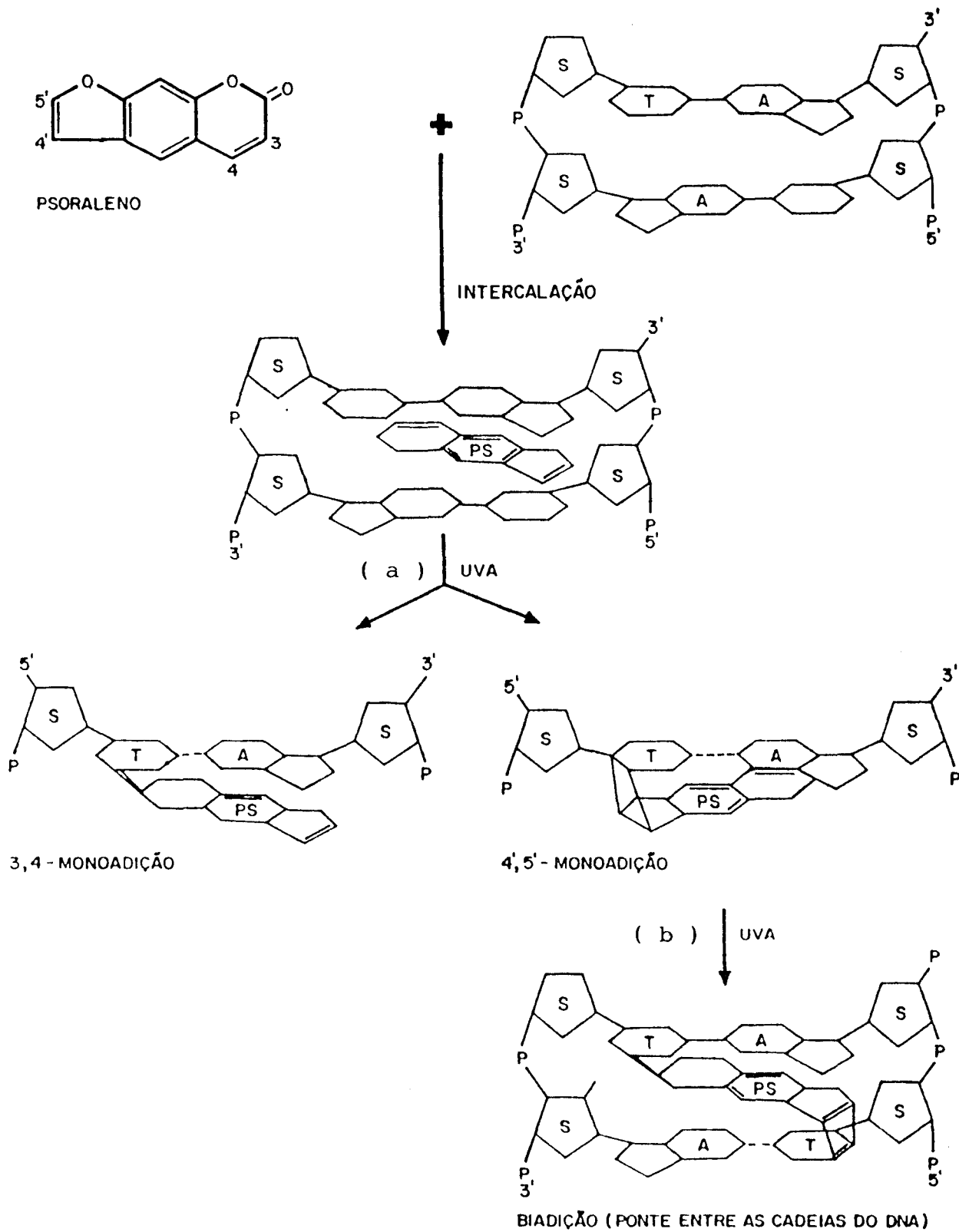


Figura 4 - Representação esquemática das fotorreações de furocumarinas mono e bifuncionais com o DNA.

P - fosfato

A - adenina

T - timina

S - açúcar

Ps - psoraleno (furocumarina)

(HENRIQUES & BRENDDEL, 1990). As lesões fotoinduzidas no DNA permitiram classificar três grupos de epistasia, necessários à reparação, que são as vias de excisão-ressíntese, de recombinação e mutagênica (KUNZ & HAYNES, 1981; MOUSTACCHI, 1987; FRIEDBERG, 1988).

As lesões fotoinduzidas por furocumarinas bifuncionais, que induzem principalmente pontes, são reparadas pelas vias de excisão-ressíntese e recombinogênica, enquanto que as lesões provocadas pelas monofuncionais dependem somente da via de excisão-ressíntese (MOUSTACCHI, 1987; AVERBECK, 1989; HENRIQUES & BRENDDEL, 1990).

Neste trabalho, procurou-se avaliar o efeito letal de uma cumarina isolada das folhas de *Z. chiloperone* na presença de radiação UVA, sobre uma cepa selvagem e duas cepas simples mutantes, deficientes nas vias de reparação por excisão-ressíntese e recombinogênica (reparação de quebras de cadeia).

As cepas mutantes tipo *rad3*, deficientes na via de reparação por excisão-ressíntese (tipo *RAD3*), são sensíveis à radiação ultravioleta 254 nm (KUNZ & HAYNES, 1981) e às monoadições e pontes resultantes da fotoadição de furocumarinas (AVERBECK & MOUSTACCHI, 1975; CHANET et al., 1983; MOUSTACCHI et al., 1983b; MILLER et al., 1984). Estudos bioquímicos em vários organismos, revelaram que a remoção de dímeros de pirimidina (formados pela ação da radiação UV 254 nm) ocorre pela excisão enzimática, seguida

pela ressíntese de DNA na área danificada (MOUSTACCHI, 1987).

Uma característica importante dos mutantes de *S. cerevisiae* deficientes na via de reparação por excisão-ressíntese, é que apresentam frequências de mutação reversa induzidas por furocumarinas mais luz ultravioleta maiores do que as observadas em cepas selvagens (AVERBECK & MOUSTACCHI, 1975). Isto sugere que as lesões induzidas por estes agentes são canalizadas para uma via indutora de erro, pois a reparação por excisão-ressíntese encontra-se bloqueada nos mutantes (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980b; BENFATO, 1989).

A reparação recombinacional em levedura foi descrita a partir da observação de que a duplicação do DNA (fases S - G2 do ciclo celular) confere um aumento da resistência ao efeito letal de vários agentes mutagênicos químicos e físicos (GAME, 1983). Ela é representada pelo grupo de genes **RAD52**. Os mutantes desta via apresentam uma acentuada sensibilidade às radiações ionizantes (KUNZ & HAYNES, 1981; GAME, 1983; MOUSTACCHI, 1987) e à fotoadição de furocumarinas (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980a). A sensibilidade dos mutantes do grupo **RAD52** a agentes capazes de produzir quebras de cadeia dupla diretamente (radiações ionizantes) ou durante a remoção da lesão (furocumarinas) indica que as quebras duplas são o principal substrato para a reparação recombinogênica (HENRIQUES & MOUSTACCHI, 1980a; SYMINGTON et al., 1983; MILLER et al., 1984).

1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A QUIMIOTAXONOMIA EM RUTACEAE

Nas últimas décadas, estudos dos metabólitos secundários têm levado a reavaliações das classificações botânicas baseadas somente em dados morfológicos e geográficos. Assim, propostas de novos sistemas referendados no conteúdo químico, juntamente com as características morfológicas e geográficas, têm sido realizados.

Até 1987, 1612 espécies de Rutaceae foram identificadas, sendo a sua correta classificação alvo de muitas controvérsias, principalmente porque apresenta uma grande versatilidade em produzir metabólitos secundários, como alcalóides de diversos tipos estruturais, cumarinas, monoterpenos e flavonóides (FISH & WATERMAN, 1973).

Um sistema formal proposto por ENGLER (1931) e modificado por SCHOLZ (1964), com a inclusão da sub-família Aurantioideae por SWINGLE & REECE (1967), divide a família Rutaceae em 6 sub-famílias. Esta divisão taxonômica foi baseada em dados morfológicos, não formando grupos de descendentes comuns (apud SILVA et al., 1988).

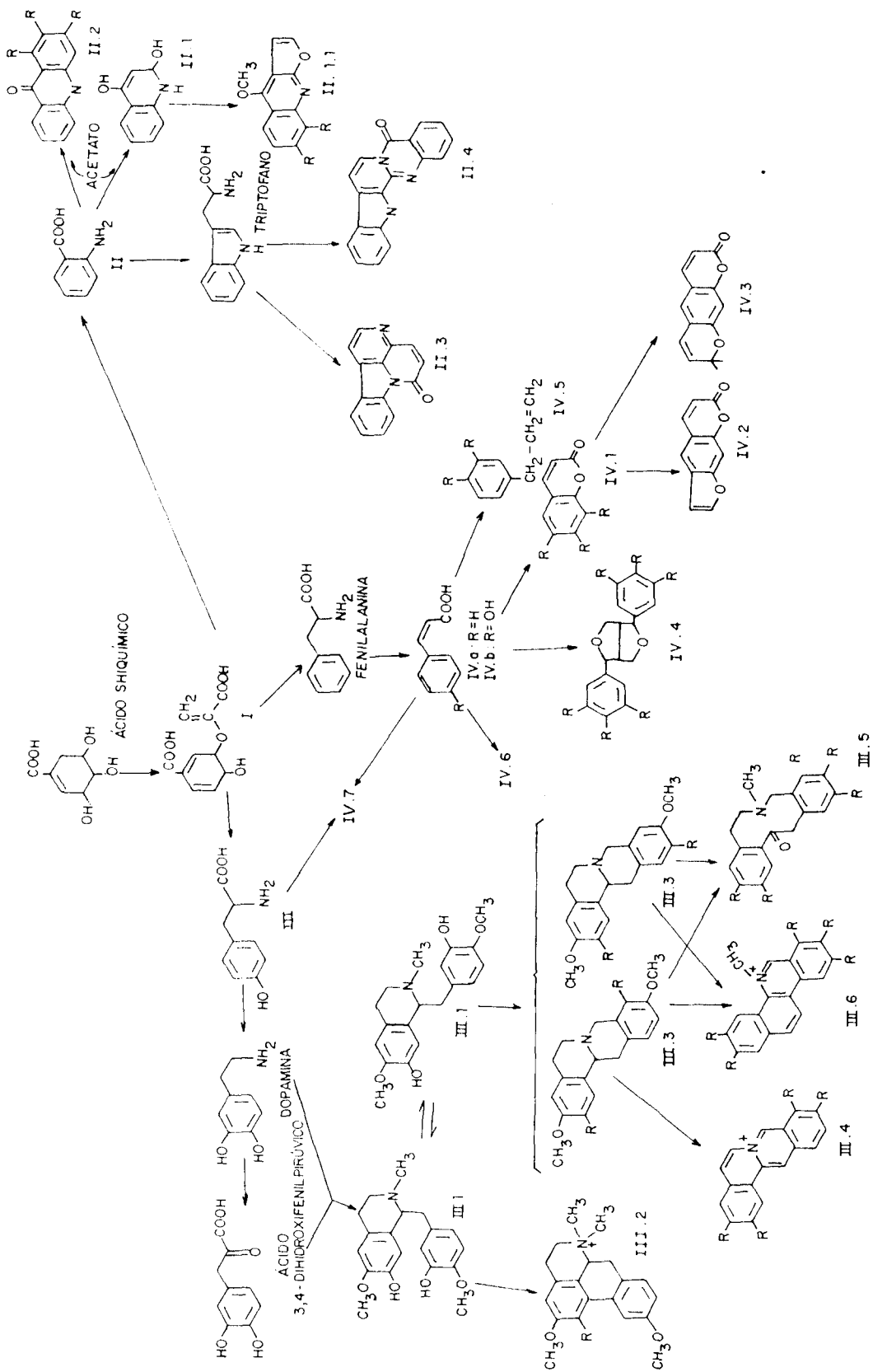
Atualmente, além dos alcalóides com estrutura 1-benziltetrahydroisoquinolina, derivados da tirosina, os alcalóides derivados do ácido antranílico têm sido propostos como marcadores quimiotaconômicos da família Rutaceae (FISH & WATERMAN, 1973). Os derivados do ácido cinâmico também têm

sido propostos como parâmetros de avanço evolucionário em Rutaceae (SILVA et al., 1988).

Os três principais precursores, ácido antranílico (II), tirosina (III), ácido cinâmico (IVa) e ácido p-hidroxicinâmico (IVb), possuem um precursor comum, o ácido chorísmico (I) (esquema 1) (FISH & WATERMAN, 1973). O ácido antranílico é formado diretamente da condensação do ácido chorísmico com o aminoácido glutamina; quatro rotas biossintéticas levam à formação dos alcalóides, sendo que a primeira forma os núcleos quinoleína 2,4-oxigenadas (II.1) e furoquinoleína (II.1.1); uma segunda rota origina a estrutura acridona (II.2). A formação de cantin-6-ona (II.3) passa pela formação do intermediário triptofano. O núcleo β -carbolinoquinazoleína (II.4) pode ser originado diretamente do ácido antranílico ou a partir do triptofano.

A estrutura 1-benziltetrahydroisoquinolina intermediária (III.1) forma-se pela conversão da tirosina em dopamina e ácido 3,4-dihidroxifenil pirúvico. Ela pode existir sob dois arranjos espaciais, cujas vias biossintéticas levam à formação de aporfinas (III.2) e tetrahydroprotoberberinas (III.3), os quais originam, por sua vez, protoberberinas (III.4), protopinas (III.5) e benzofenantridinas (III.6).

O ácido cinâmico (IVa) é formado a partir do ácido chorísmico por deaminação da fenilalanina. Similarmente, a deaminação da tirosina forma o ácido p-hidroxicinâmico (IVb). As cumarinas (IV.1), furanocumarinas (IV.2) e piranocumarinas (IV.3) são os compostos preferentemente derivados



Esquema 1 - Rota biossintética dos principais metabólitos secundários de Rutaceae (FISH & WATERMAN, 1973).

do ácido cinâmico. Outros compostos, como lignanas (IV.4), fenilpropenos (IV.5), flavonóides (IV.6) e amidas (IV.7), também são formados por esta rota.

1.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Zanthoxylum*/*Fagara*

O gênero *Zanthoxylum*, incluindo *Fagara*, foi classificado por ENGLER (1931) dentro da sub-família Rutoideae, da tribo Xanthoxyleae e da sub-tribo Evodiinae. A questão taxonômica entre o gênero *Zanthoxylum* e *Fagara* foi por muito tempo objeto de controvérsia. Em 1959, FOSBERG estabeleceu uma diferenciação entre os dois taxos, na qual *Zanthoxylum* seria aquele que combina o gênero com a presença de um e dois verticilos no perianto ou a presença de um verticilo no perianto, cujo representante seria *Z. fraxineum* Willd. (*Z. americanum* Mill.); *Fagara* seria o gênero tropical com dois verticilos no perianto, tipificado por *F. pterota* L. (WATERMAN, 1975).

O complexo *Zanthoxylum*/*Fagara* é dividido em grupos de acordo com a presença ou ausência de alcalóides furoquinoleínicos e benzilisoquinoleínicos. Este fato, juntamente com a presença de alcalóides considerados básicos dentro da família (uma acridona, algumas quinazolininas, cantin-6-ona e amidas), levam à consideração de que este gênero é o mais

primitivo em Rutaceae e deve ser classificado como tribo isolada (SILVA et al., 1988). Atualmente, os dados morfológicos e químicos têm permitido uma mais correta diferenciação entre os taxos *Zanthoxylum* e *Fagara*.

1.5. OBJETIVOS

Em vista do que foi exposto, os objetivos deste trabalho foram:

- Isolar e identificar alcalóides e cumarinas de raízes e folhas de *Zanthoxylum chiloperone* Martius ex Engler;
- Avaliar potenciais efeitos genotóxicos dos compostos isolados em sistemas procarióticos (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) e eucarióticos (*Saccharomyces cerevisiae*).

2. EXPERIMENTAL

2.A. MATERIAL

2.1. MATERIAL VEGETAL

As folhas e raízes de *Zanthoxylum chiloperone* foram coletadas no Campus da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (São Leopoldo - RS) no mês de maio de 1989, em pré-floração. O material botânico foi identificado por J. Pirani (Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica) e uma amostra autêntica foi depositada no herbário do Instituto de Biociências, USP, sob número SPF 62982. Para descrição botânica desta espécie, ver ENGLER, 1874.

O material foi seco à sombra e temperatura ambiente (25⁰ C) e reduzido a pó grosseiro em moinho de lâminas.

2.2. MATERIAL PARA ANÁLISE BIOLÓGICA E QUÍMICA

2.2.1. Cromoteste SOS - Sistema procariótico

Foi utilizada a cepa PQ37 de *Escherichia coli*, cujo genótipo é: **F, thr his-4 pyrD thi galE galK (ou galT) lac U169 srl-300::Tn10 rpo rpsl uvrA rfa trp::Muc sulA::Mud (Ap. lac) cts** (QUILLARDET et al., 1982a; QUILLADERT & HOFNUNG, 1985).

2.2.2. Teste de Ames (Salmonella/microsoma)

Este método baseia-se no uso de cepas da bactéria *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina e que reverterem à prototrofia pelo tratamento com agentes genotóxicos (AMES, 1971; AMES et al. 1973a, 1973b, 1975; MARON & AMES, 1983).

As cepas de *S. typhimurium* utilizadas neste trabalho apresentam diferentes mutações no operon da histidina. A linhagem TA98 detecta mutagênicos que causam erro no quadro de leitura, apresentando como ponto preferencial oito repetitivos resíduos GC -CGCGCGCG- no gene **hisD (hisD3052)**
-GC GCGCGC-

A linhagem TA100 detecta mutagênicos que causam substituição de pares de base, sendo o par GC o ponto preferencial à reversão. Esta mutação ocorre por substituição de uma prolina -GGG- por uma leucina -GAG- no gene **hisG** (**hisG46**).
-CCC- -CTC-

Além da mutação no operon da histidina, estas linhagens têm outras mutações, como mutação **rfa** que induz perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede celular, incrementando a difusão de estruturas moleculares maiores, mutação **uvrB** que leva à deleção de um gene e o qual codifica para o sistema de reparação por excisão do DNA, e fator **R** plasmidial de resistência (pKM101), que contém o gene **mucAB**, que aumenta as mutagêneses espontânea e induzida, elevando a sensibilidade a uma variedade de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (VARGAS, 1992).

2.2.3. Teste de Sobrevivência em sistema eucariótico

Foram utilizadas as linhagens de **Saccharomyces cerevisiae** selvagem haplóide N123 (**MAT a his1**), e as mutantes LP 2649-1a (**MAT α rad 3-2, leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, can^r**) e XS-95-6C (**MAT α rad 52-1, his 3- 1, leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, trp 1-289, cir⁰, can^r**), defectivas nas vias de reparação por excisão-ressíntese e recombinação, respectivamente (para revisão ver FRIEDBERG, 1988).

2.2.4. Equipamentos e suas padronizações

Foram utilizados neste trabalho os seguintes aparelhos: moinho de lâminas CONDUX - WERK tipo LV 15M; balança MARTE modelo 1001; balança SARTORIUS modelo 2403; estufa termostatizada FABBE modelo 119; evaporadores rotatórios BUCHI tipo B 461 e BUHLER tipo rV 2; lâmpada de ultravioleta 254 e 365 nm UVG, modelo UVGL - 58; balança METTLER PC 2200; centrífuga SORVALL Instruments (DU PONT) RC-5C, com refrigeração; microscópio AUS JENA; banho de água FABBE - PRIMAR mod. 169; contador de colônias NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC; mixer THERMOLYNE tipo 37600; estufa ÉTICA; autoclave PHOENIX mod. AV18; banho de água giratório NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC mod. G76; incubadora com agitação TE 325 MARCONI-TECNAL.

Os pontos de fusão foram determinados em microscópio de ponto de fusão tipo KOFLER e não foram corrigidos.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro PERKIN - ELMER COLEMAN 124, com registrador modelo 56, da Faculdade de Farmácia, UFRGS.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram realizados em espectrofotômetro PERKIN - ELMER 983, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os espectros de ressonância magnética nuclear pró-tônica (RMN - ^1H) foram obtidos a 250 MHz em solução de deuteroclorofórmio, utilizando-se tetrametilsilano como referência interna, em aparelho BRUCKER WB AM 300, da Universidade de Toulouse, França.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN - ^{13}C) foram realizados no equipamento acima citado, frequência 75,47 MHz.

Os espectros de massas por impacto eletrônico (EM-/IE) e por ionização química foram obtidos em espectrômetro de massas NERMAG 10 - 10A, da Universidade de Toulouse, França.

2.2.5. Reagentes, Solventes, Drogas, Meios de Cultura

2.2.5.1. Análise química

Os reagentes e solventes, com grau de pureza pró-análise, utilizados neste trabalho foram: ácido clorídrico, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio (procedência Merck), sulfato de sódio anidro (procedência Reagen), diclorometano, clorofórmio, metanol, acetato de etila, n-butanol, n-hexano, dimetilsulfóxido, etanol (procedência Merck), éter de petróleo (procedência Reagen).

2.2.5.2. Análise biológica

2.2.5.2.1. Cromoteste SOS

Para o cromoteste SOS, o meio de cultura (meio LB) foi constituído por 1% de bactotripton (Difco, E.U.A.), 0,5% de Bacto Yeast extract (Difco, E.U.A.) e 0,5% de NaCl. Este meio foi suplementado com ampicilina, na concentração de 20 mg/l (meio LA). O meio LA sempre foi preparado algumas horas antes dos experimentos.

O substrato para a enzima β -galactosidase foi a o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG - Sigma Co., E.U.A.), na concentração de 4 mg/ml em tampão fosfato pH=7,0 (61 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M e 39 ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M), ajustado com solução de NaOH 1,0 N.

O substrato para a enzima fosfatase alcalina foi o p-nitrofenil fosfato (PNPP - Sigma Co., E.U.A.), na concentração de 4 mg/ml em tampão Tris pH=8,05 (121 g Tris(hidroximetil)aminometano e 1 g de dodecilsulfato de sódio (SDS) por litro de água), cujo pH foi ajustado com solução de HCl 1,0 N. Este tampão também foi o utilizado no teste da fosfatase alcalina.

O tampão para o ensaio da β -galactosidase foi: 16,1g Na_2HPO_4 ; 5,5g NaH_2PO_4 ; 0,75g KCl ; 0,25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50mg ditioneitol (DTT - Sigma Co., E.U.A.); 1,0g SDS por litro de água, pH=7,75 ajustado com solução HCl 1,0 N .

Os controles positivos utilizados para os testes sem e com ativação metabólica foram, respectivamente, soluções de 4-óxido-1-nitroquinoleína (4-NQO) e aflatoxina B1 (AFB1), ambas procedência Sigma Co., E.U.A., dissolvidas em DMSO.

As soluções de 5-metoxicantina-6-ona, em diversas concentrações, foram obtidas em DMSO.

Para interromper as reações, foram utilizadas soluções de Na_2CO_3 1,0 M e NaOH 1,5 M.

2.2.5.2.2. Teste de Ames

No teste de Ames, o crescimento das cepas testadoras foi realizado em meio líquido completo -meio NB- contendo 8% de meio nutriente ("nutrient broth" - BBL: Div. Becton, Dickinson and Company, Cockeysville, Maryland, E.U.A. ou "oxoide $\text{n}^\circ 2$ - oxoid LTD, Basingstoke, Hants, England) e 5% de cloreto de sódio.

No teste de avaliação mutagênica, empregou-se o meio mínimo -MM- (30 ml/placa) constituído por uma mistura de glicose a 40% (50 ml) e meio E de Vogel-Bonner (20 ml), sulfato de magnésio a 1 %, ácido cítrico monohidratado a

10%, fosfato de potássio dibásico a 50%, fosfato de sódio e amônio a 17,5%, solidificado com 1,5% de agar (Difco, E.U.A.).

Durante a cultura das células em placas no teste de avaliação mutagênica, foi utilizado o agar de superfície contendo 0,6% agar e 0,5% cloreto de sódio, suplementado com 10% de solução de histidina e biotina (0,5 mM).

As placas master para a estocagem das cepas eram constituídas de meio mínimo suplementado (30 ml/placa), acrescido de histidina (260 μ M/placa), biotina (3 μ M/placa) e ampicilina (750 μ g/placa). Todos os reagentes e aminoácidos foram adquiridos da E.Merck, Darmstadt, Alemanha.

Os controles positivos utilizados para o teste sem ativação metabólica foram 4-óxido-1-nitroquinoleína (4NQO) para a cepa TA98 e azida sódica (AZS) para a cepa TA100. O teste com ativação metabólica utilizou como controle positivo a aflatoxina B1 (AFB1) para ambas as cepas. Estas substâncias e a 5-metoxicantin-6-ona foram dissolvidas em DMSO, utilizado como controle negativo.

2.2.5.2.3. Teste de sobrevivência em *S. cerevisiae*

Para o teste de sobrevivência em sistema eucariótico, o crescimento das células e a determinação da viabilidade celular foram realizadas em meio completo

(YEPD), contendo 0,5% de extrato de levedura (Difco, E.U.A.), 2% de bactopectona (Difco, E.U.A.) e 2% de glicose. Para a solidificação do meio YEPD, acrescentava-se 2% de bactoagar (Difco, E.U.A.).

A solução de anisocumarina H foi obtida em solução hidroetanólica 40%, na concentração de 5×10^{-5} M.

2.2.6. Cromatografias

As cromatografias em coluna foram realizadas sobre gel de sílica 60 Merck (70-230 Mesh).

As cromatografias em camada delgada analíticas e preparativas foram desenvolvidas sobre placas de vidro (20 x 20 cm) revestidas com 0,25 e 0,5 mm de adsorvente, respectivamente, utilizando-se equipamento para cromatoplas DESAGA, segundo STHAL (1969). Foram utilizados os géis de sílica GF₂₅₄ e HF₂₅₄ (procedência Merck). As cromatoplas sempre foram ativadas por 30 minutos a 105⁰ C, imediatamente antes do uso. Também utilizou-se cromatofolhas (Al) de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck).

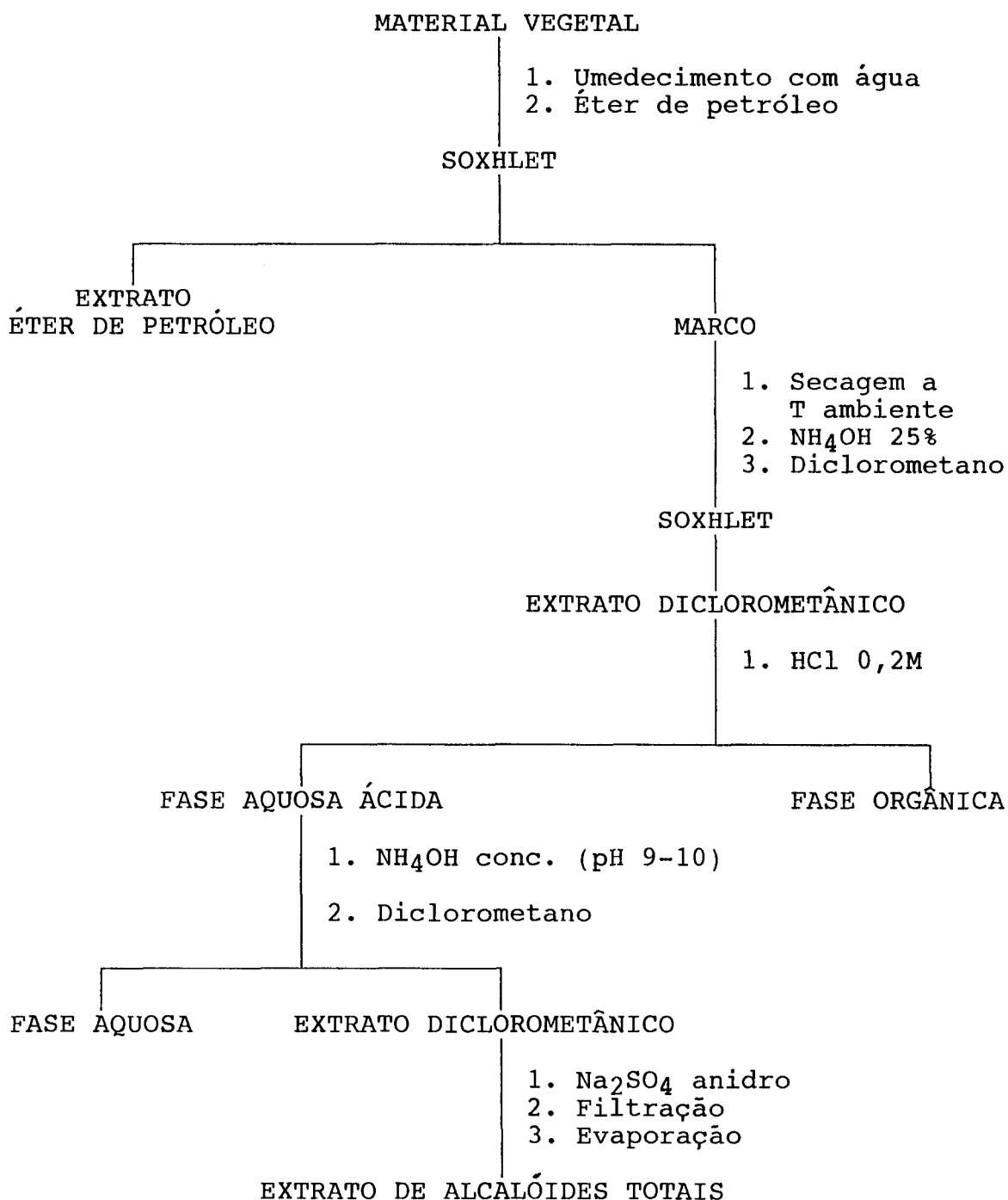
A detecção das substâncias foi feita através de luz ultravioleta (254 e 365 nm) e reagente cromogênico Dragendorff (STHAL, 1969).

2.B. MÉTODOS

2.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos das raízes e folhas foram obtidos submetendo os materiais vegetais, secos e moídos, a um leve umedecimento com água destilada, seguido de extração em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo por 15 horas. Os marcros, após secagem, foram alcalinizados com solução de hidróxido de amônio 25% e extraídos em aparelho de Soxhlet com diclorometano até reação de Mayer negativa.

O extrato diclorometânico das folhas foi particionado com ácido clorídrico 0,2 M, para obtenção dos alcalóides sob forma de cloridratos. A solução ácida foi lavada com diclorometano para eliminação de resíduos neutros. Em seguida, as bases foram liberadas pelo hidróxido de amônio concentrado a pH 9,0 - 10,0 e extraídas pelo diclorometano até reação de Mayer negativa. As soluções reunidas foram lavadas com água destilada, secas sobre sulfato de sódio anidro e após filtração, evaporadas em rotavapor a temperatura inferior a 40⁰ C (esquema 2).



Esquema 2 - Extração dos alcalóides totais das folhas de *Zanthoxylum chiloperone*.

2.4. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES E CUMARINAS

2.4.1. Extrato éter de petróleo das raízes:

O extrato éter de petróleo forneceu um abundante precipitado e um sobrenadante com características oleosas.

Análise por cromatografia em camada delgada do precipitado, em gel de sílica HF₂₅₄ no sistema eluente CHCl₃ : CH₃OH (98 : 2, v/v) , mostrou a presença de três componentes altamente majoritários, que foram isolados por cromatografia em coluna de gel de sílica 60 Merck, empacotada com a mistura n-hexano : clorofórmio (80 : 20, v/v), usando como eluentes n-hexano : clorofórmio em misturas de polaridade crescente. A eluição foi acompanhada por luz ultravioleta 365 nm. Os três compostos obtidos nas frações 13 (eluída com n-hexano : clorofórmio na proporção 30 : 70), 15 (eluída com n-hexano : clorofórmio na proporção 10 : 90) e 19 (eluída com clorofórmio) foram codificados como ZC1, ZA1 e ZA2, respectivamente.

O composto ZC1 foi purificado por cristalização na mistura clorofórmio : n-hexano (99 : 1, v/v). Os compostos ZA1 e ZA2 foram recristalizados em metanol.

O sobrenadante do extrato éter de petróleo foi igualmente submetido à cromatografia em coluna de gel de sílica 60, utilizando como eluente o sistema acima citado. Foi obtido um produto majoritário, codificado como ZC2, na fração 4 (eluída com n-hexano : clorofórmio na proporção 60 : 40), que foi cristalizado em etanol.

2.4.2. Extrato éter de petróleo das folhas:

O extrato éter de petróleo das folhas forneceu um abundante precipitado, que foi purificado por sucessivas lavagens com éter de petróleo, seguida de cristalização em clorofórmio, fornecendo uma substância cromatograficamente pura, codificada como ZC3.

2.4.3. Extrato diclorometânico das raízes:

Para o isolamento e purificação dos alcalóides, foram utilizadas sucessivas cromatografias em camada preparativa, em gel de sílica HF254. Os compostos codificados como ZA3 e ZA4 foram isolados através da mistura eluente CHCl_3 : CH_3OH (95:5, v/v), e submetidos à cromatografia em camada delgada em gel de sílica HF254, no

sistema eluente clorofórmio : metanol (98 : 2, v/v), apresentando valores de R_f iguais a 0,35 e 0,59, respectivamente.

2.4.4. Extrato de alcalóides totais das folhas:

Este extrato forneceu um alcalóide majoritário, isolado por cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando o sistema CHCl_3 : CH_3OH (97:3, v/v), o qual demonstrou ser idêntico ao produto isolado do extrato éter de petróleo obtido das raízes do vegetal e codificado como ZA2.

2.5. IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES E CUMARINAS

2.5.1. Composto ZA1

P.F. = $162^0 - 163^0$ C (Metanol)

Espectro U.V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 251, 259, 268, 297, 345, 360, 380.

Espectro I.V. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3457, 1671, 1428.

Espectro de Massas - IE (T 250^0 C) picos a m/z(intensidade relativa): M. 220 (100); 192 (91); 166 (2); 165 (23); 164 (33).

Espectro RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3): 8,69 (1H, d, $J=5,02$ Hz); 8,48 (1H, d, $J=8,21$ Hz); 7,93 (1H, d, $J=7,93$ Hz); 7,90 (1H, d, $J=10,80$ Hz); 7,78 (1H, d, $J=5,02$ Hz); 7,58 (1H, ddd, $J=1,18$; 6,38 e 7,30 Hz); 7,41 (1H, ddd, $J=0,94$; 5,69 e 7,59 Hz); 6,86 (1H, d, $J=10,80$ Hz) ppm.

2.5.2. Composto ZA2

P.F. = $229^0 - 233^0$ C (Metanol)

Espectro U.V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ (nm): 245, 250, 261, 295, 340, 356, 375.

Espectro de Massas - IQ/ NH_3 : 251 (M + H^+).

Espectro RMN - ^1H (250 MHz, CDCl_3): 8,75 (1H, d, $J=5,75$ Hz); 8,70 (1H, dd, $J=7,51$ e $1,65$ Hz); 8,15 (1H, dd, $J=7,43$ e $0,87$ Hz); 7,95 (1H, d, $J=5,46$ Hz); 7,75 (1H, ddd, $J=7,46$; $8,25$ e $1,21$ Hz); 7,60 (1H, ddd, $J=7,65$; $7,61$ e $1,02$ Hz); 7,45 (1H, s); 4,10 (3H, s, O- CH_3) ppm

2.5.3. Composto ZA3

P.F. = 208^0 C (clorofórmio-metanol)

Espectro U.V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 227, 282 e 320.

Espectro I.V. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 1600, 1480, 1365, 1285 e 1110.

Espectro de Massas - IE (T 180⁰ C) picos a m/z (intensidade relativa): 350 (14); 349 (52); 348 (100); 334 (29); 333 (84); 318 (22); 290 (70); 275 (40).

Espectro RMN - ¹H (90 MHz, CDCl₃): 7,95 (1H, s); 7,70 (1H, d, J=8 Hz); 7,50 (1H, d, J=8 Hz); 7,40 (1H, d, J=8 Hz); 7,15 (1H, s); 6,82 (1H, d, J=8 Hz); 6,60 (1H, s); 6,10 (2H, s); 3,75 (3H, s); 3,07 (3H, s); 2,45 (3H, s) ppm.

2.5.4. Composto ZA4

P.F. = 178⁰ - 180⁰ C (Clorofórmio-Metanol)

Espectro U.V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 251, 320 e 332.

Espectro I.V. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 1615, 1500, 1365, 1290, 1085; 870 e 825.

Espectro de Massas - IE (T 180⁰ C) picos a m/z (intensidade relativa): M 259 (53); 258 (28); 244 (100); 230 (62); 216 (29); 201 (32); 200 (13); 199 (19); 184 (7); 173 (13); 130 (14).

2.5.5. Composto ZC1

P.F. = $124^0 - 125^0$ C (n-Hexano-Clorofórmio)

Espectro I.V. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 3486; 2971; 1714; 1257; 1142 e 1110.

Espectro de Massas - IE (70eV) picos a m/z (intensidade relativa): M 342 (30); 327 (100); 314 (1); 309 (18); 299 (1); 286 (5); 285 (15); 271 (31); 253 (17).

Espectro RMN - ^1H (250 MHz CDCl_3): 7,90 (1H, d, $J=9,67$ Hz); 6,79 (1H, d, $J=16,51$ Hz); 6,65 (1H, d, $J=16,50$ Hz); 6,49 (1H, d, $J=10,02$ Hz); 6,15 (1H, d, $J=9,67$ Hz); 5,56 (1H, d, $J=10,02$ Hz); 3,67 (3H, s, O- CH_3); 2,70 (1H, s, OH); 1,39 (12H, s, 4 x CH_3) ppm.

2.5.6. Composto ZC2

P.F. = $141^0 - 142^0$ C (Etanol)

Espectro de Massas - IQ/ NH_4 : 325 (M + H^+).

Espectro RMN- ^1H (250 MHz, CDCl_3): 7,99 (1H, d, $J=9,69$ Hz);

7,37 (1H, d, J=16,54 Hz); 6,71 (1H, d, J=16,54Hz); 6,59 (1H, d, J=10,02 Hz); 6,24 (1H, d, J=9,68Hz); 5,64 (1H, d, J=10,02Hz) 5,12 (2H, d, =CH₂); 3,75 (3H, s, O-CH₃); 2,01 (3H, s, CH₃-C=CH₂); 1,46 (6H, s, 2 x CH₃) ppm.

Espectro RMN-¹³C (75,47 MHz, CDCl₃): 160,74 (C₂); 157,22 (C₇); 152,69 (C₉); 149,34 (C₃"); 142,98 (C₅); 138,36 (C₄); 136,39 (C₁"); 129,29 (C₃'); 117,72 (C₄'); 117,18 (C₂"); 116,45 (C₄"); 112,86 (C₃); 111,62 (C₈); 110,82 (C₁₀); 106,29 (C₆); 77,93 (C₂'); 61,55 (CH₃O); 28,04 (C₅' e C₆'); 18,35 (C₅") ppm.

2.5.7. Composto ZC3

P.F. = 77⁰ - 80⁰ C (Clorofórmio)

Espectro U.V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm): 247 e 322.

Espectro I.V. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹): 3460; 2930; 1710; 1620; 1280 e 1130.

Espectro de Massas - IE (T 250⁰ C) picos a m/z (intensidade relativa): 162 (100); 134 (27); 133 (4)
105 (6); 85 (94); 77 (9); 67 (13).

Espectro RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃): 7,64 (1H, d, J=9,46 Hz); 7,37 (1H, d, J=8,29 Hz); 6,86 (1H, d, J=2,26Hz); 6,83 (1H, dd, J=8,91 e 2,26Hz); 6,25 (1H, d, J=9,49 Hz); 5,57 (1H, tq, J=6,39 e 5,38Hz); 5,18 (1H, d, J=8,51 Hz); 4,62 (2H, d, J=6,39 Hz); 4,55 (1H, dd, J=11,85 e 5,58 Hz); 2,27 (2H, m, J=8,22 e 5,83 Hz); 1,83 (3H, s, CH₃); 1,70 (1H, s, OH); 1,70 (6H, s, 2 x CH₃) ppm.

Espectro RMN-¹³C (75,47 MHz, CDCl₃): 161,93 (C7); 161,20 (C2); 155,79 (C8a); 143,37 (C4); 138,84 (C3'); 135,40 (C7'); 128,67 (C2'); 127,27 (C5); 121,69 (C6'); 113,11 (C6); 112,96 (C3); 112,45 (C4a); 101,52 (C8); 66,33 (C5'); 65,17 (C1'); 47,65 (C4'); 25,65 (7'-CH₃); 18,16 (7'-CH₃); 17,04 (3'-CH₃) ppm.

2.6. CROMOTESTE SOS - TESTE EM SISTEMA PROCARIÓTICO

O cromoteste SOS, preconizado por QUILLARDET et al. (1982a e b), fundamenta-se na avaliação quantitativa da filamentação bacteriana, uma das funções SOS. A enzima β -galactosidase é sintetizada no interior das células, sob o controle de um gene que se desreprime quando as funções SOS são induzidas (figura 1). A quantidade de enzima produzida é medida colorimetricamente, permitindo assim avaliar a amplitude da desrepressão provocada pelo tratamento com a substância em estudo.

O teste resume-se na determinação, após tratamento com determinadas concentrações da droga, das quantidades de β -galactosidase e de fosfatase alcalina (esta enzima é produzida constitutivamente) sintetizadas. Assim, a proporção entre as duas atividades (β -galactosidase/fosfatase alcalina) representa a medida específica da β -galactosidase.

2.6.1. Procedimento

A técnica utilizada foi descrita por QUILLARDET et al. (1982a), modificada por MERSCH-SUNDERMANN et al. (1991).

Uma amostra (100 μ l) da cepa PQ37 foi suspensa em 10ml de meio LA e incubada, com agitação, a 37⁰ C por 13

horas. Desta cultura, em fase estacionária, tomou-se 100 μ l que foram adicionados a 5ml de meio LA, e incubado a 37⁰ C até atingir turvação que apresentasse uma densidade ótica entre 0,3 e 0,4, no comprimento de onda de 600 nm, correspondente a uma concentração celular de aproximadamente 2×10^8 células/ml. O meio LA foi utilizado como branco.

A cultura, em fase exponencial de crescimento, foi diluída 10 vezes em meio LB ou na mistura de ativação metabólica ("S9 mix"), que será descrita posteriormente. Desta diluição, porções de 600 μ l foram distribuídas em uma série de tubos contendo 20 μ l de soluções de 4-NQO em DMSO, nas concentrações finais de 10 e 100 ng, ou soluções de AFB1 em DMSO, nas concentrações finais de 5 e 20 ng, ou soluções de 5-metoxicantin-6-ona em DMSO, nas concentrações finais de 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 e 40,0 ng. Estas misturas foram incubadas a 37⁰ C por 2 horas, com agitação.

Foi incluído no teste um tubo controle sem bactéria e sem droga, utilizado como branco na leitura espectrofotométrica final, e um outro tubo controle com bactéria e sem droga, utilizado como fator de indução igual a 1,0.

A mistura incubada foi dividida em 2 séries iguais de 310 μ l em cada tubo.

2.6.1.1. Teste para β -galactosidase

A cada um dos tubos de uma das séries acima citadas, foram adicionados 2,7 ml de tampão fosfato (pH=7,75) e 600 μ l da solução 0,4% de ONPG. As misturas foram incubadas a 37⁰ C por 25 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 2 ml de solução de Na₂CO₃ 1,0M.

A absorbância a 420 nm foi medida contra o tubo controle (branco).

2.6.1.2. Teste para fosfatase alcalina

Aos tubos da outra série foram adicionados 2,7 ml de tampão Tris (pH=8,05) e 600 μ l da solução 0,4% de PNPP. As misturas foram incubadas a 37⁰ C por 25 minutos, após o qual interrompeu-se a reação pela adição de 2 ml de solução de NaOH 1,5 N. As leituras de absorbância foram feitas a 420 nm contra o branco.

2.6.1.3. Fração microsomal S9

Algumas substâncias não possuem atividade genotóxica direta, sendo ativas somente quando submetidas a metabolização. Estas substâncias são referidas como mutagênicos indiretos, uma vez que somente os seus

metabólitos são capazes de induzir lesões no DNA das células tratadas. Como o cromoteste SOS utiliza bactérias, as quais são incapazes de realizar metabolização, foi empregada a mistura de ativação metabólica "S9 mix" com a finalidade de detectar a possível mutagenicidade indireta da substância testada. A fração microsomal S9, preparada a partir de fígado de ratos Sprague-Dawleys pré-tratados com Aroclor-1254 segundo recomendação de MARON & AMES (1983), foi adquirida de Molecular Toxicology Inc. (MOLTOXTM), lote 0337. O certificado do controle de qualidade da fração S9 encontra-se no anexo 1.

2.6.1.3.1. Preparação da mistura de ativação "S9 mix"

A mistura foi sempre preparada imediatamente antes do experimento, sendo mantida em gelo.

O método de preparação da "S9 mix" foi o indicado por MARON & AMES (1983) e modificado por QUILLARDET & HOFNUNG (1985). Essa mistura de ativação continha em 10 ml: fração S9 1,0 ml; meio LB 5,85 ml; tampão Tris 0,4 M (pH=7,4) 2,5 ml; MgCl₂ 80 µmoles e KCl 330 µmoles (0,20 ml da mistura MgCl₂ 0,40 M e KCl 1,65 M); G6P (Glicose-6-fosfato - Sigma Co.) 50 µmoles (0,05 ml de G6P 1,0 M); NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - Sigma Co.) 40 µmoles (0,4 ml de NADP 0,1 M).

2.6.2. Fator de indução

A função SOS é avaliada pelo chamado fator de indução. Fatores de indução menores do que 2,0, indicam que não houve indução significativa da função SOS, ou seja, a droga não desreprimiu o gene estrutural da β -galactosidase, lacZ.

As atividades enzimáticas são expressas pelas unidades de β -galactosidase e fosfatase alcalina ($U_{\beta\text{-gal}}$ e U_{pase} , respectivamente), calculadas como descrito por MILLER (1972):

$$U = A_{420} \times 1000 / t \times v \times (A_{600}/10)$$

sendo: A_{420} = absorvância a 420 nm; t = tempo de conversão do substrato, em minutos; v = volume de cultura usado, em ml; A_{600} = absorvância a 600 nm.

O fator de indução é a razão $R(x)/R(o)$, sendo $R(x) = U_{\beta\text{-gal}}/U_{\text{pase}}$ determinada para os tubos teste, e $R(o) = U_{\beta\text{-gal}}/U_{\text{pase}}$ determinada para o tubo com cepa e sem a droga.

2.7. TESTE DE AMES - Salmonella/MICROSSOMA

2.7.1. Condições de crescimento

As cepas de *S. typhimurium* cresceram no meio líquido completo, até uma densidade de $1 - 2 \times 10^9$ células/ml, em banho de água a 37^0 C, ao abrigo da luz e sob aeração. O tempo de crescimento era regulado por conexão do sistema de aeração a um relógio programável ("Kienzle") que desligava após período de 10 horas.

A densidade foi estimada por medida de turbidez em espectrofotômetro, correspondendo a uma absorbância de 0,4 no comprimento de onda de 650 nm. Esta leitura era confirmada por teste de titulação em placa de meio completo solidificado e as culturas colocadas, a seguir, em banho de gelo até a realização dos ensaios. Durante os testes, foram mantidas à temperatura ambiente para evitar o choque térmico, quando da semeadura em agar de superfície a 45^0 C.

2.7.2. Procedimento

A metodologia empregada foi a descrita por MARON & AMES (1983). No teste foi adotado o procedimento de incorporação, tanto com a presença de mistura de ativação

metabólica ("S9 mix"), previamente descrita, como na ausência de ativação metabólica.

No teste para determinar a atividade mutagênica, o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona, nas concentrações de 60 e 80 $\mu\text{g/placa}$ em DMSO, foi adicionado a 100 μl de uma cultura bacteriana (crescimento de $1 - 2 \times 10^9$ células/ml em meio NB), sendo imediatamente acrescentado ao tubo teste de 1 a 3 ml do agar de superfície, previamente incubado a 45^0 C e suplementado com solução de histidina e biotina. Após agitação breve, procedeu-se à semeadura em placas contendo meio mínimo. A contagem das colônias revertentes foi realizada após 48 horas de incubação em estufa a 37^0 C.

Em cada teste foram acrescentados os controles negativos - solvente DMSO - e positivos - 0,5 μg de 4-óxido-1-nitroquinoleína e 5,0 μg de azida sódica nos ensaios sem ativação metabólica para as cepas TA98 e TA100, respectivamente. Nos ensaios com fração "S9 mix", utilizou-se 0,5 μg de aflatoxina B1 para ambas as cepas.

Também realizou-se um teste utilizando o procedimento de pré-incubação, com ativação metabólica, para a cepa TA100, nas doses de 5; 10; 20 e 40 μg de 5-metoxicantin-6-ona. Por este procedimento, faz-se uma incubação prévia da droga com a cultura bacteriana por 25 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura de 37^0 C. As outras etapas seguem como descrito anteriormente.

2.7.3. Interpretação e Avaliação dos Resultados

As curvas dose-resposta foram avaliadas pelo programa SALMONEL elaborado pelo Dr. Myers (Environmental Monitoring System Laboratory, EPA-Software versão 2.3, abril de 1988), e descrito em VALENT (1990) e VARGAS (1992). Após a análise por este programa, foram consideradas positivas as concentrações que induziram o dobro da atividade mutagênica do controle negativo e efeito dose-resposta.

Este programa prevê que a relação dose-resposta destes ensaios, em qualquer das cepas testadas ou condições de metabolização, pode ser enquadrado em pelo menos quatro modelos de regressão: CONSTANTE $y=b$; LINEAR $y=bx+a$; LINTOX1 (linear atenuado por toxicidade exponencial simples) $y=(bx+a)^{-T_1X}$; LINTOX2 (linear atenuado por toxicidade exponencial elevada à segunda potência) $y=(ax+b)^{-T_2X}$. Ainda considera o modelo BERNSTEIN (BERNSTEIN et al., 1982) que consiste em retirar da análise uma ou mais doses usando somente os resultados compatíveis com o modelo linear. O programa SALMONEL apresenta um fluxograma, onde os resultados das diferentes doses de uma substância são analisados numa sequência de etapas, buscando ajuste ao modelo de regressão mais aceitável.

Através desta análise, podemos obter o cálculo e a significância estatística de :

-Análise de variância entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas (teste F), onde

valores de P menores ou iguais a 5% indicam diferenças significativas;

-Ajuste ao modelo mais aceitável: os valores de P indicam a probabilidade de ajuste ao modelo mais adequado. Quando estes valores são inferiores a 5%, o programa somente calcula a análise da variância;

-Cálculo da positividade da curva dose-resposta: os valores de P menores ou iguais a 5% indicam que existe inclinação positiva na origem da curva.

Quando ocorre análise de variância significativa entre as diferentes doses e inclinação positiva na origem da curva dose-resposta, podemos levar em consideração outros parâmetros calculados pelo programa. A inclinação da reta na parte linear da curva dose-resposta fornece a estimativa do número de revertentes induzidos por unidade de amostra testada ($\text{His}^+/\mu\text{g}$ de amostra). O programa estabelece ainda o erro padrão e o intervalo de confiança de 90% desta determinação.

2.8. TESTE DE SOBREVIVÊNCIA - TESTE EM SISTEMA EUCARIÓTICO

2.8.1. Condições de crescimento:

Foram utilizadas culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa selvagem N123 nas fases estacionária e exponencial de crescimento, e as cepas mutantes *rad3-2* e *rad52-1* na fase exponencial de crescimento.

A fase estacionária de crescimento foi obtida a partir de uma pré-cultura de células em fase estacionária. As células foram inoculadas com o auxílio de uma alça de platina em 10 ml de meio líquido YEPD. Após 72 horas de incubação a 30⁰ C com aeração por agitação, a cultura atingia uma concentração de 2 - 4 x 10⁸ células/ml, correspondendo a fase estacionária e apresentando aproximadamente 2% da população de células em broto.

As células em fase exponencial de crescimento foram obtidas pela inoculação de 2 - 3 x 10⁶ células/ml de uma pré-cultura em fase estacionária, em 10 ml de meio líquido YEPD. Após 5 horas de incubação a 30⁰ C com aeração por agitação, a cultura alcançava a fase exponencial de crescimento (1 - 2 x 10⁷ células/ml) apresentando cerca de 20-30% de células em broto.

2.8.2. Curvas de sobrevivência:

Para realizar as curvas de sobrevivência, foram realizados previamente os testes variando a concentração da droga e o tempo de incubação com a mesma.

As culturas em fases estacionária e exponencial de crescimento foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, a 5⁰ C. Os sedimentos foram ressuspensos em 10 ml de solução salina - EDTA (10 mM) e novamente centrifugados. Este procedimento foi repetido duas vezes para eliminar resíduos de meio de cultura.

A determinação do número total de células e da proporção de células em broto foi realizada por contagem ao microscópio ótico com câmara de Burkner.

Em todos os tratamentos, as células foram diluídas em solução salina à concentração de 3×10^6 células/ml. As suspensões das cepas selvagem e mutantes foram incubadas com a solução de anisocumarina H (5×10^{-5} M) a 4⁰C durante 30 minutos, ao abrigo da luz. Após este tratamento, alíquotas (10 ml) das suspensões foram irradiadas em placas de Petry de vidro, abertas, com doses cumulativas de $4 \text{ KJm}^{-2}\text{min}^{-1}$ de radiação 365 nm. A taxa de dose ao nível da preparação foi de $1,1 \text{ KJm}^{-2}\text{min}^{-1}$, conforme estabelecido por dosímetro Black-Ray J221 (Ultraviolet Products Inc., San Gabriel, Califórnia, E.U.A.), para comprimento de onda na faixa de ultravioleta de 365 nm. Um recipiente pirex contendo 2 cm de altura de água destilada, colocado entre a preparação e a

lâmpada, foi utilizado como filtro para eliminar eventuais comprimentos de onda inferiores a 340 nm e evitar o aquecimento da preparação celular (AVERBECK & MOUSTACCHI, 1975). Durante a irradiação, a placa de Petry foi agitada manualmente com a finalidade de manter a homogeneização da distribuição de dose nas suspensões.

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias, alíquotas de células, tratadas ou não tratadas, foram retiradas após serem irradiadas com cada uma das doses de UVA e depois de convenientemente diluídas em solução salina foram semeadas em placas de Petry contendo meio YEPD (média de 200 cél./placa). Após 4-7 dias de incubação a 30⁰ C em estufa, realizava-se a contagem de colônias para determinar a viabilidade celular.

Na apresentação dos resultados, foram calculadas as médias de 2 experimentos por cepa, em triplicata cada um.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE QUÍMICA

3.1.1. Rendimento das extrações e das substâncias isoladas

Os rendimentos dos extratos éter de petróleo das raízes e folhas, diclorometânico das raízes e em alcalóides totais das folhas de **Zanthoxylum chiloperone** estão apresentados na tabela 1. As quantidades obtidas de substâncias isoladas podem ser vistas na tabela 2.

Tabela 1 - Rendimentos das extrações das raízes e folhas de **Zanthoxylum chiloperone**.

EXTRATOS	PESO DE MATERIAL (g)	RENDIMENTO %
RAÍZES:		
Éter de petróleo	200	18
Diclorometânico	200	12
FOLHAS:		
Éter de petróleo	170	12
Alcalóides totais	170	0,1

Tabela 2 - Rendimentos em substâncias isoladas das raízes e folhas de *Zanthoxylum chiloperone*.

EXTRATOS	PRODUTO ISOLADO	RENDIMENTO (mg)
RAÍZES:		
Éter de petróleo	ZA1	607
	ZA2	32
	ZC1	510
	ZC2	42
Diclorometânico	ZA3	20
	ZA4	136
FOLHAS:		
Éter de petróleo	ZC3	422
Alcalóides totais	ZA2	14

3.1.2. Caracterização e identificação das substâncias isoladas

3.1.2.1. Composto ZA1

O composto codificado como ZA1, majoritário, isolado das raízes de *Zanthoxylum chiloperone*, apresentou-se como um sólido cristalino com ponto de fusão em 162⁰ - 163⁰ C.

Na região do ultravioleta, o espectro mostrou máximos de absorção nos comprimentos de onda 251, 259, 268, 297, 345, 360 e 380 nm, característicos para uma estrutura do tipo carbazol estendido (SANGSTER & STUART, 1964).

O espectro na região do infravermelho (figura 5) apresentou bandas de absorção em 1671 e 1428 cm^{-1} correspondentes ao estiramento do grupamento carbonila do núcleo lactama (FISH & WATERMAN, 1971) e à deformação axial C-N, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 1979).

O espectro de massas (figura 6) apresentou o pico molecular a m/z 220, pico base, compatível com a fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$. Perdas sucessivas de 28 e 27 u.m.a. conduzem aos picos a m/z 192 (91%), 164 (33%) e 165 (23%) (esquema 3), permitindo sugerir para ZA1 uma estrutura do tipo cantinona (JOULE & DJERASSI, 1964; DAS et al., 1964; FISH & WATERMAN, 1971).

O espectro de ressonância magnética protônica (figura 7 e tabela 3), apresentou seis sinais característicos do anel β -carbolínico não substituído, além de dois dubletos correspondentes aos prótons das posições 4 e 5 do núcleo lactâmico (BOVEY, 1969; JACKMAN & STERNHEL, 1969; FISH & WATERMAN, 1971, MEMORY & WILSON, 1982).

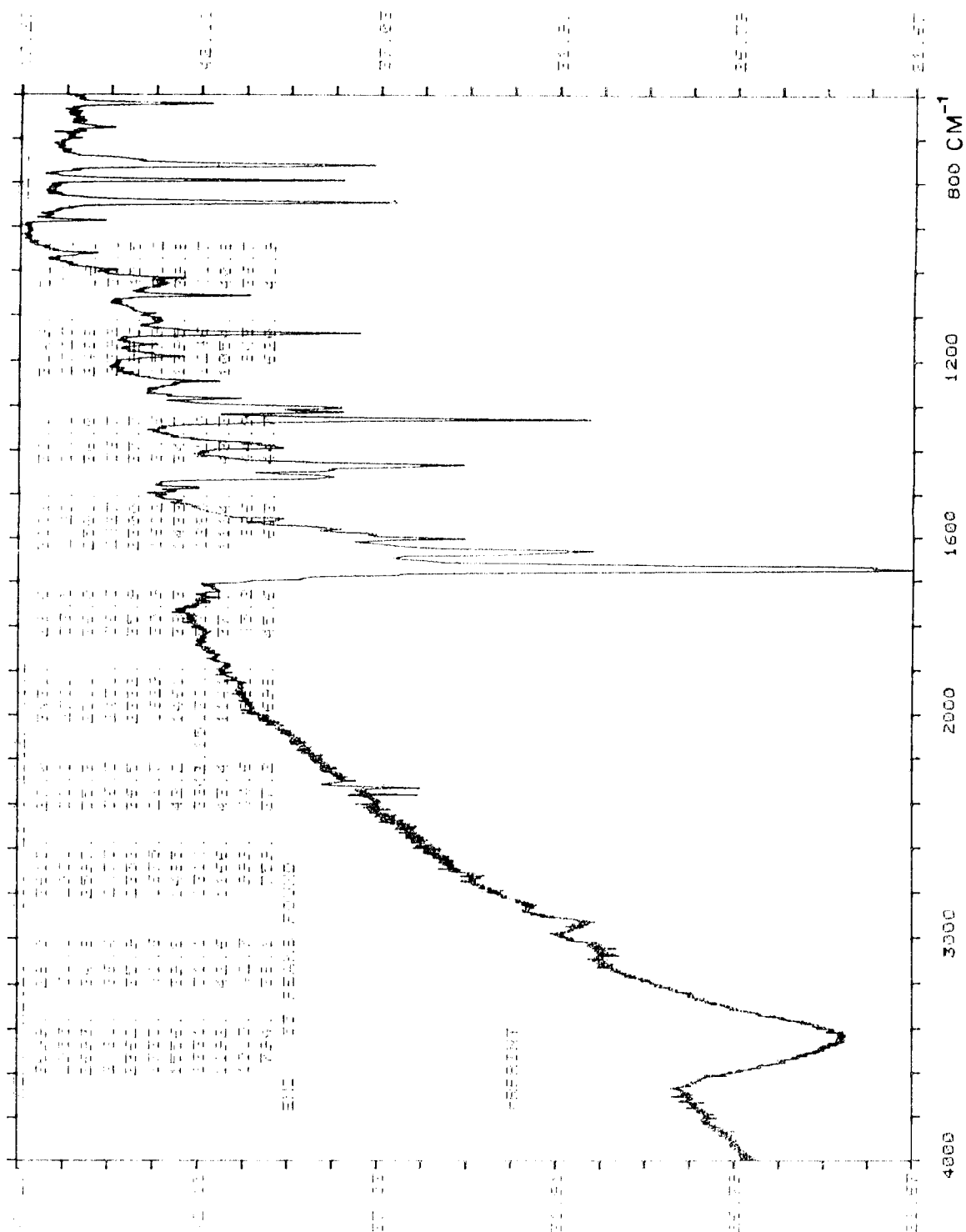


Figura 5 - Composto ZA1 - Espectro na região do infravermelho

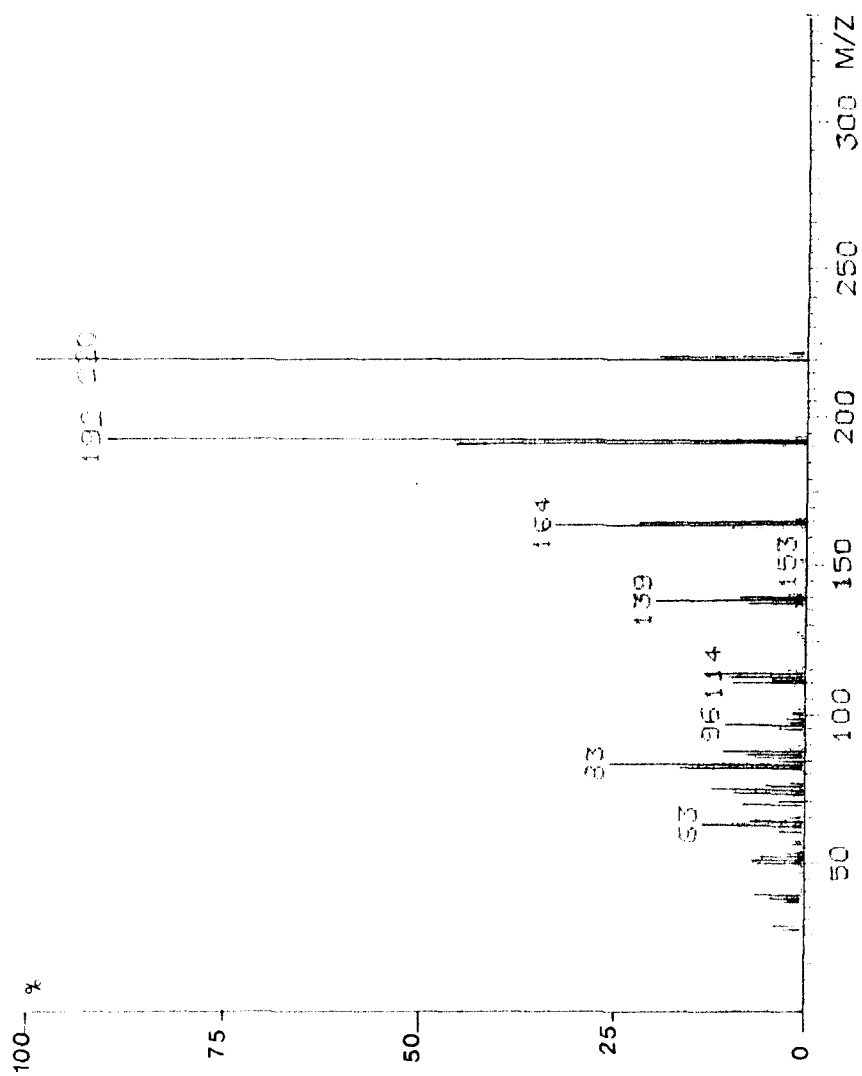
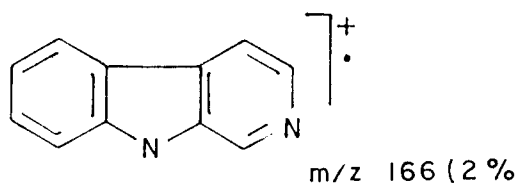
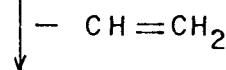
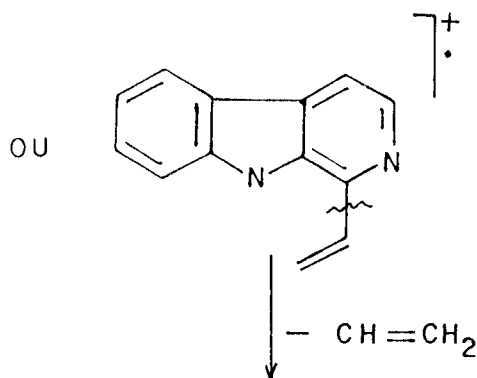
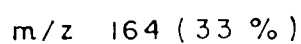
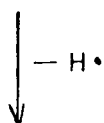
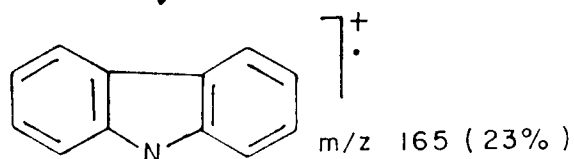
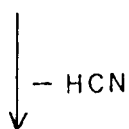
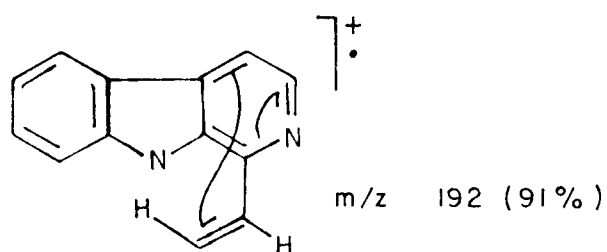
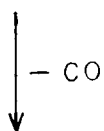
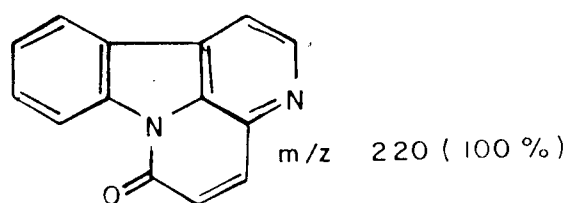


Figura 6 - Composto ZAl - Espectro de massas por impacto eletrônico



Esquema 3 - Composto ZAl - Fragmentações no Espectrômetro de Massas.

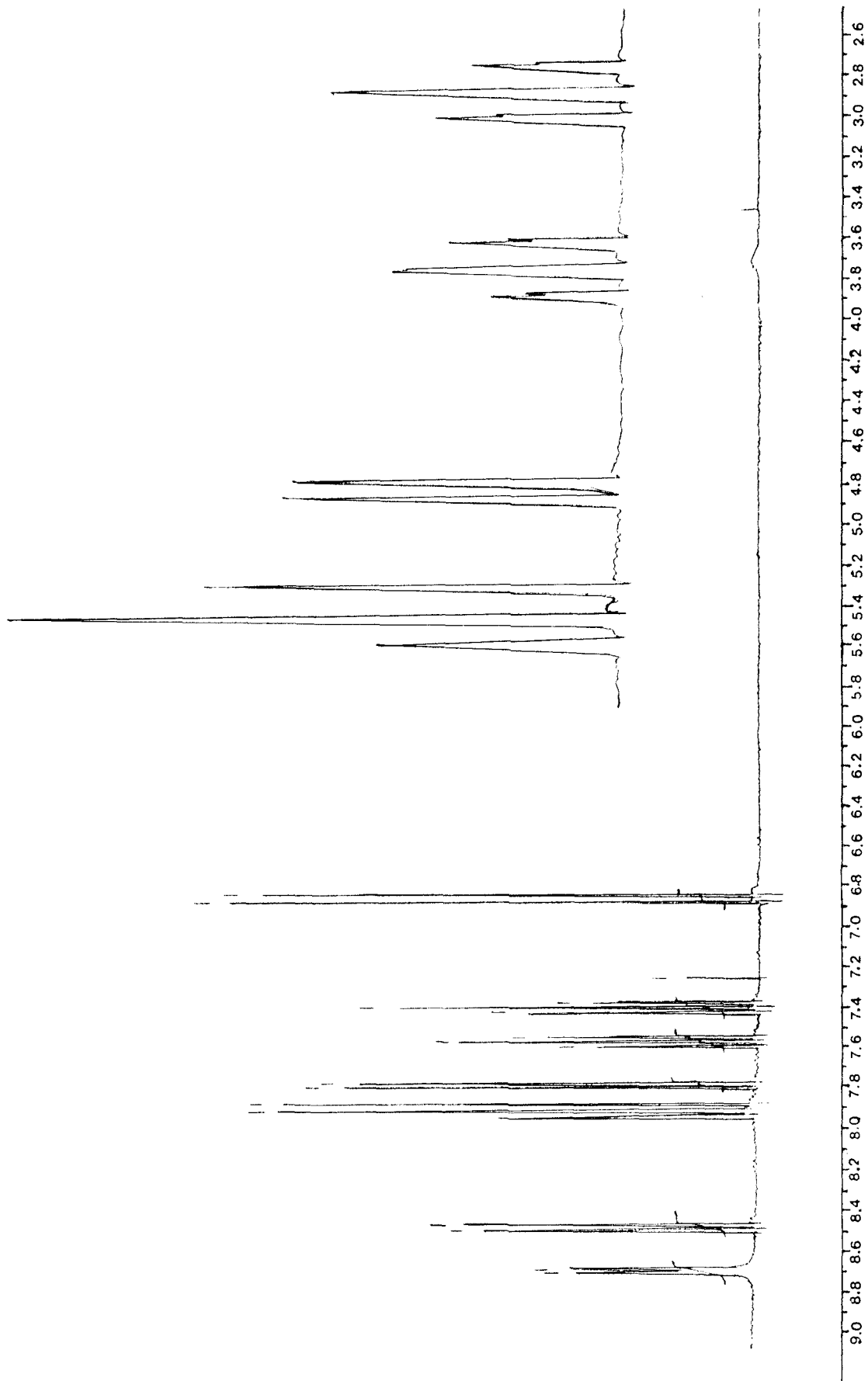
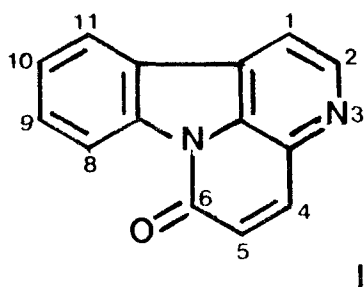


Figura 7 - Composto ZAl - Espectro de ressonância magnética protônica

Tabela 3 - Dados espectrais de RMN-¹H a 250 MHz em CDCl₃ do composto ZA1.

PRÓTON	(ppm)	J (Hz)
1	8,69 d	5,02
2	7,78 d	5,02
4	7,90 d	10,80
5	6,86 d	10,80
8	8,48 d	8,21
9	7,58 ddd	1,18; 6,38; 7,30
10	7,41 ddd	0,94; 5,69; 7,59
11	7,93 d	7,93

O conjunto de dados espectroscópicos permitiu propor a estrutura de um alcalóide, cantin-6-ona (I), para o composto ZA1, a qual foi confirmada por comparação com amostra autêntica.



A amostra autêntica de cantin-6-ona foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. J. Beal, Louisiana State University, U.S.A.

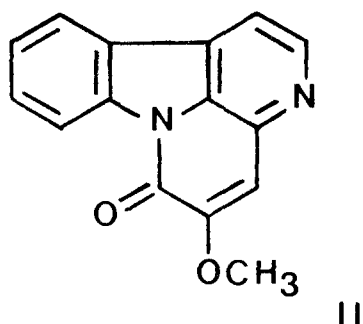
3.1.2.2. Composto ZA2

O composto ZA2, isolado das folhas e raízes de **Zanthoxylum chiloperone** como um sólido cristalino, apresentou o ponto de fusão em 229 - 233⁰ C.

O espectro na região do ultravioleta mostrou máximos de absorção nos comprimentos de onda 245, 250, 261, 295, 340, 356 e 375 nm, sugerindo a presença de um núcleo do tipo cantinona (SANGSTER & STUART, 1965).

No espectro de massas por ionização química (NH₃) (figura 8), observou-se o pico de intensidade máxima a m/z 251 (M + 1), compatível com a fórmula C₁₅H₁₀N₂O₂.

O espectro de ressonância magnética protônica (figura 9), comparado com o obtido para a cantin-6-ona, apresentou um sinal simples adicional de intensidade três a δ 4,10, indicando a presença de um grupamento metoxila. A localização deste grupamento no esqueleto da molécula foi determinada como sendo no C5, através da análise dos prótons em campo baixo, onde o sistema de dois dubletos foi substituído por um sinal simples a δ 7,45 (CORDELL et al., 1978; FORGACS et al., 1982), caracterizando para o composto ZA1 a estrutura da 5-metoxicantin-6-ona (II).



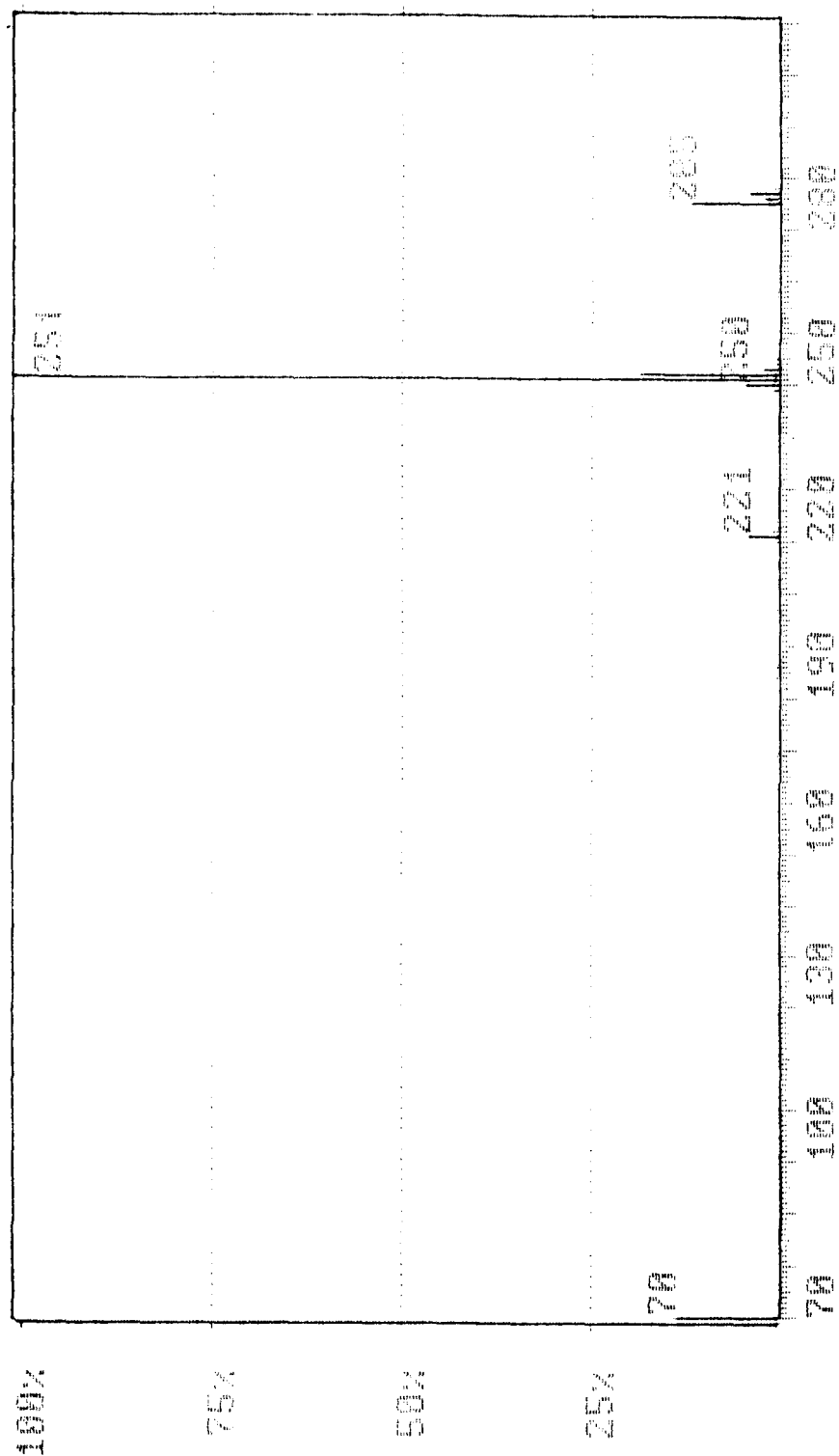


Figura 8 - Composto ZA2 - Espectro de massas por ionização química (NH₃)

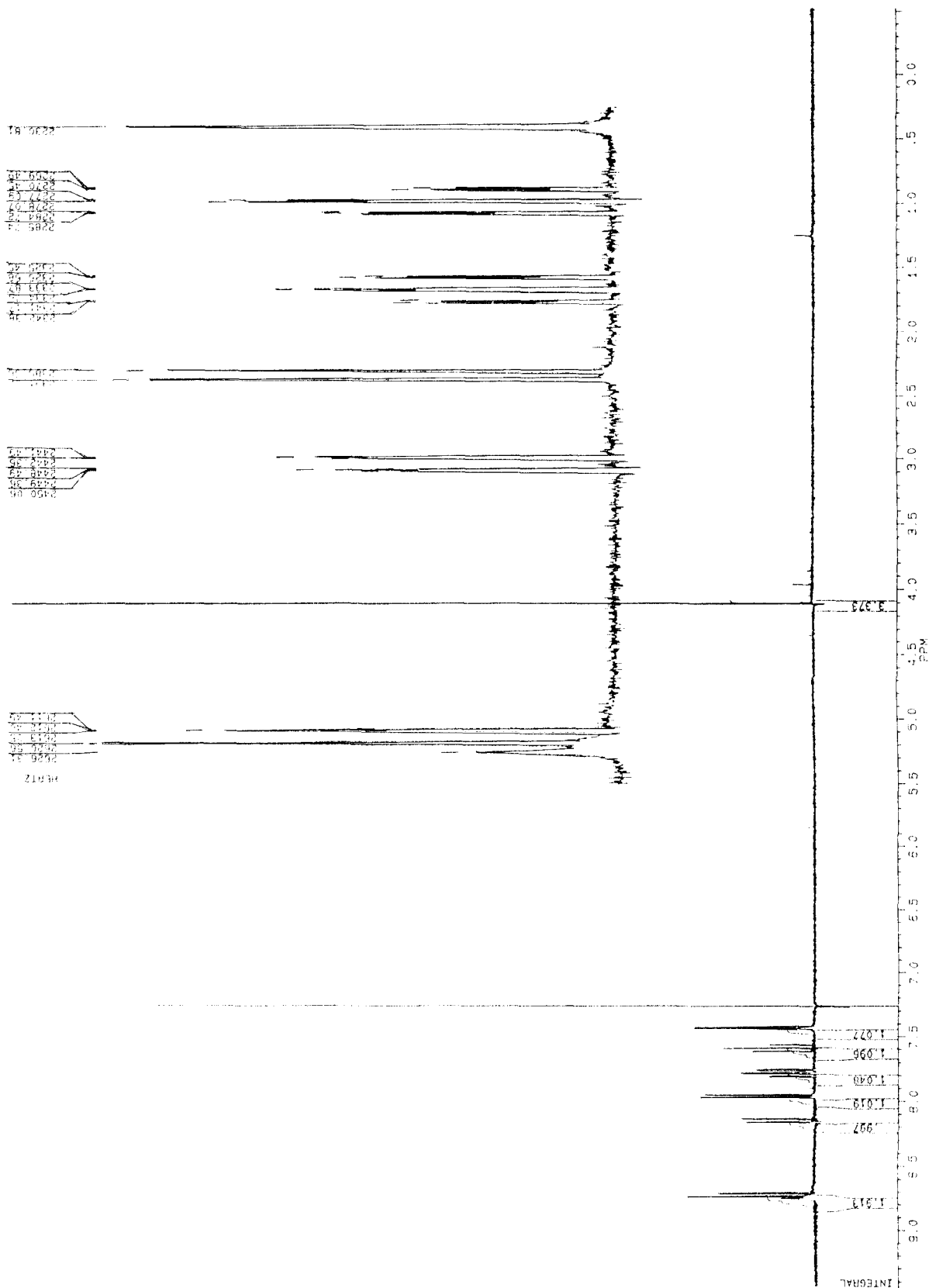


Figura 9 - Composto 2A2 - Espectro de ressonância magnética protônica

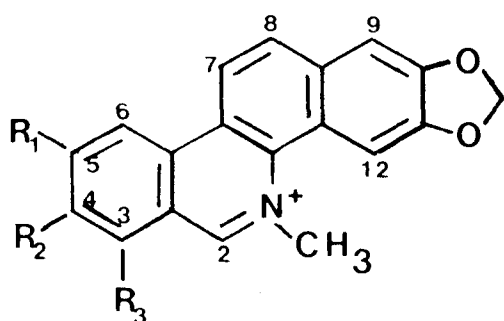
3.1.2.3.Composto ZA3

O sólido cristalino codificado como ZA3, isolado das raízes de *Zanthoxylum chiloperone*, apresentou o ponto de fusão em 208⁰ C.

Os máximos de absorção em 227, 282 e 320 nm no espectro na região do ultravioleta são característicos do cromóforo benzofenantridínico (SANGSTER & STUART, 1965).

No espectro na região do infravermelho (figura 10), observou-se banda de absorção referente a deformação axial da ligação carbono-nitrogênio a 1365 cm⁻¹ e bandas a 1285 e 1110 cm⁻¹, características de deformações axiais assimétricas e simétricas, respectivamente, de uma função éter (SILVERSTEIN et al., 1979).

No espectro de massas, o pico base a m/z 348 (figura 11), compatível com a fórmula C₂₁H₁₈O₄N, podendo corresponder às estruturas quaternárias dos alcalóides isômeros celeritrina (III.a) e nitidina (III.b).



III.a. Celeritrina:
R₁=H; R₂=R₃=OCH₃

III.b. Nitidina:
R₁=R₂=OCH₃; R₃=H

O espectro de ressonância magnética protônica (figura 12), apresentou três sinais simples de intensidade 3, a δ 3,75; 3,07 e 2,45, característicos a três metilas

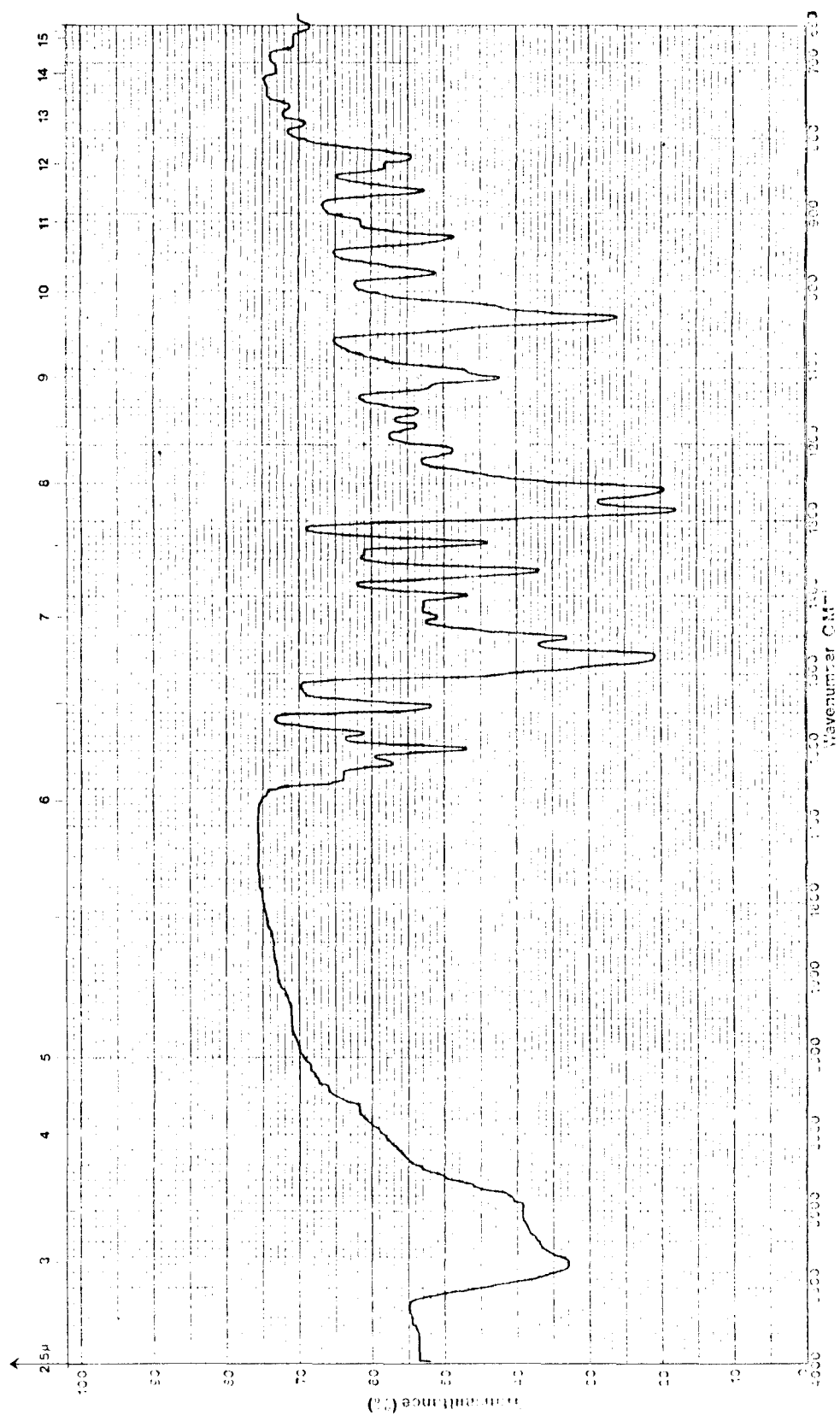


Figura 10 - Composto ZA3 - Espectro na região do infravermelho

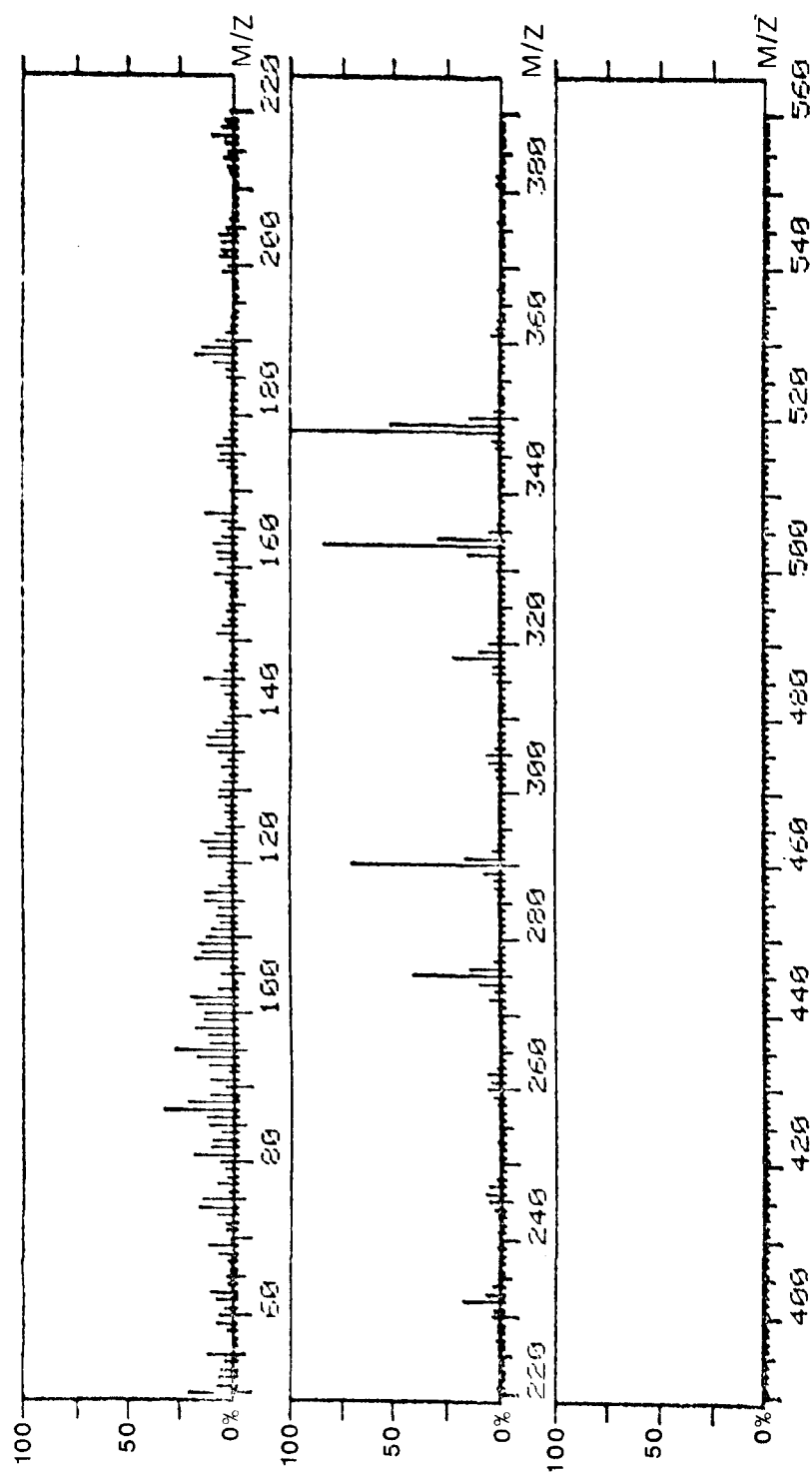


Figura 11 - Composto ZA3 - Espectro de massas por impacto eletrônico

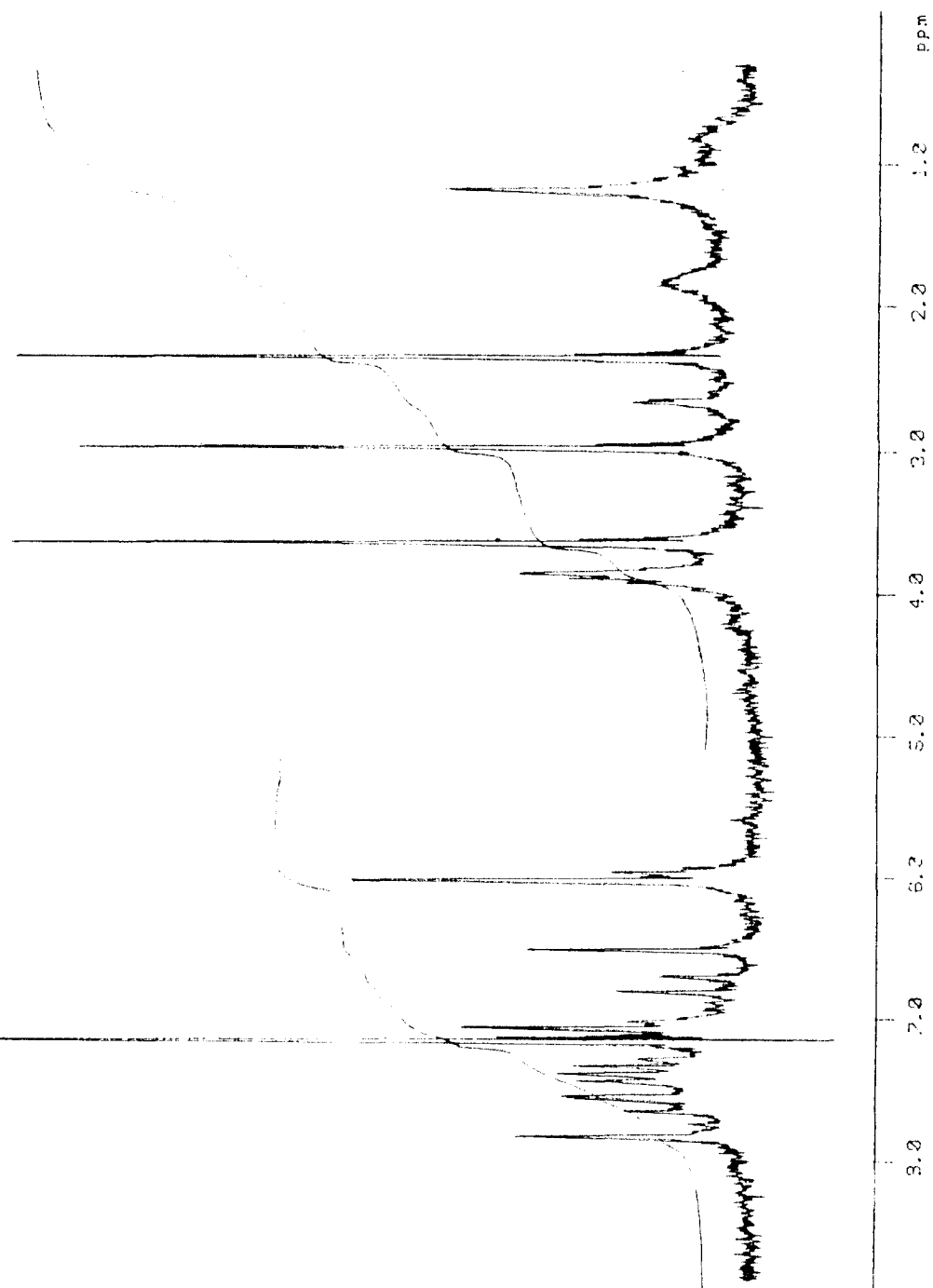


Figura 12 - Composto ZA3 - Espectro de ressonância magnética protônica

ligadas a oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Um sinal de intensidade 2 a δ 6,10 indicou os dois prótons do grupo metilenodioxí.

Os prótons aromáticos das posições 2, 9 e 12 apareceram como três sinais simples a δ 7,95; 7,15 e 6,60. Os outros quatro prótons aromáticos, referentes às posições 5, 6, 7 e 8, mostraram sinais duplos a δ 7,70; 7,50; 7,40 e 6,82, com constante de acoplamento de 8,0 Hz, característica de sistema orto (SILVERSTEIN et al., 1979).

Os dados espectrais permitiram propor para o composto ZA3 a estrutura do alcalóide quaternário celeritrina (III.a), a qual foi confirmada por comparação com amostra autêntica.

3.1.2.4. Composto ZA4

O composto ZA4, isolado das raízes de *Zanthoxylum chiloperone* como um sólido cristalino, apresentou ponto de fusão entre 178⁰ - 180⁰ C.

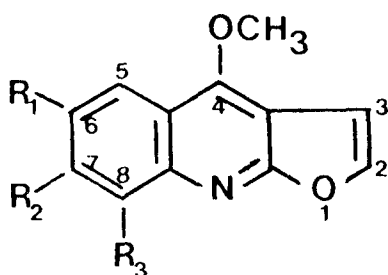
Seu espectro na região do ultravioleta foi caracte-

A amostra autêntica de celeritrina foi gentilmente cedida pela Prof.^a G. von Poser, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

rístico para cromóforo furoquinoleínico, com máximo de absorção em 251 nm e uma banda larga de 320 a 312 nm (SANGSTER & STUART, 1965).

O espectro na região do infravermelho (figura 13) mostrou bandas de absorção em 1365 cm^{-1} para a deformação axial carbono-nitrogênio, correspondente a aminas aromáticas terciárias (SILVERSTEIN et al., 1979), a 1290 cm^{-1} para a deformação axial assimétrica de ligações carbono-oxigênio-carbono, a 1085 cm^{-1} para a deformação axial simétrica de uma função éter aromático e a 870 e 825 cm^{-1} para o anel furano (ALSHAMA et al., 1979).

O espectro de massas (figura 14) apresentou o pico molecular a m/z 259, correspondente à fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$. Os alcalóides com núcleo furoquinoleínico e compatíveis com esta fórmula, podem ter as estruturas de esquimianina (IV.a), cocusaginina (IV.b) e maculosidina (IV.c).



IV.a. Esquimianina:
 $\text{R}_1=\text{H}$; $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{OCH}_3$

IV.b. Cocusaginina:
 $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OCH}_3$; $\text{R}_3=\text{H}$

IV.c. Maculosidina:
 $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OCH}_3$; $\text{R}_2=\text{H}$

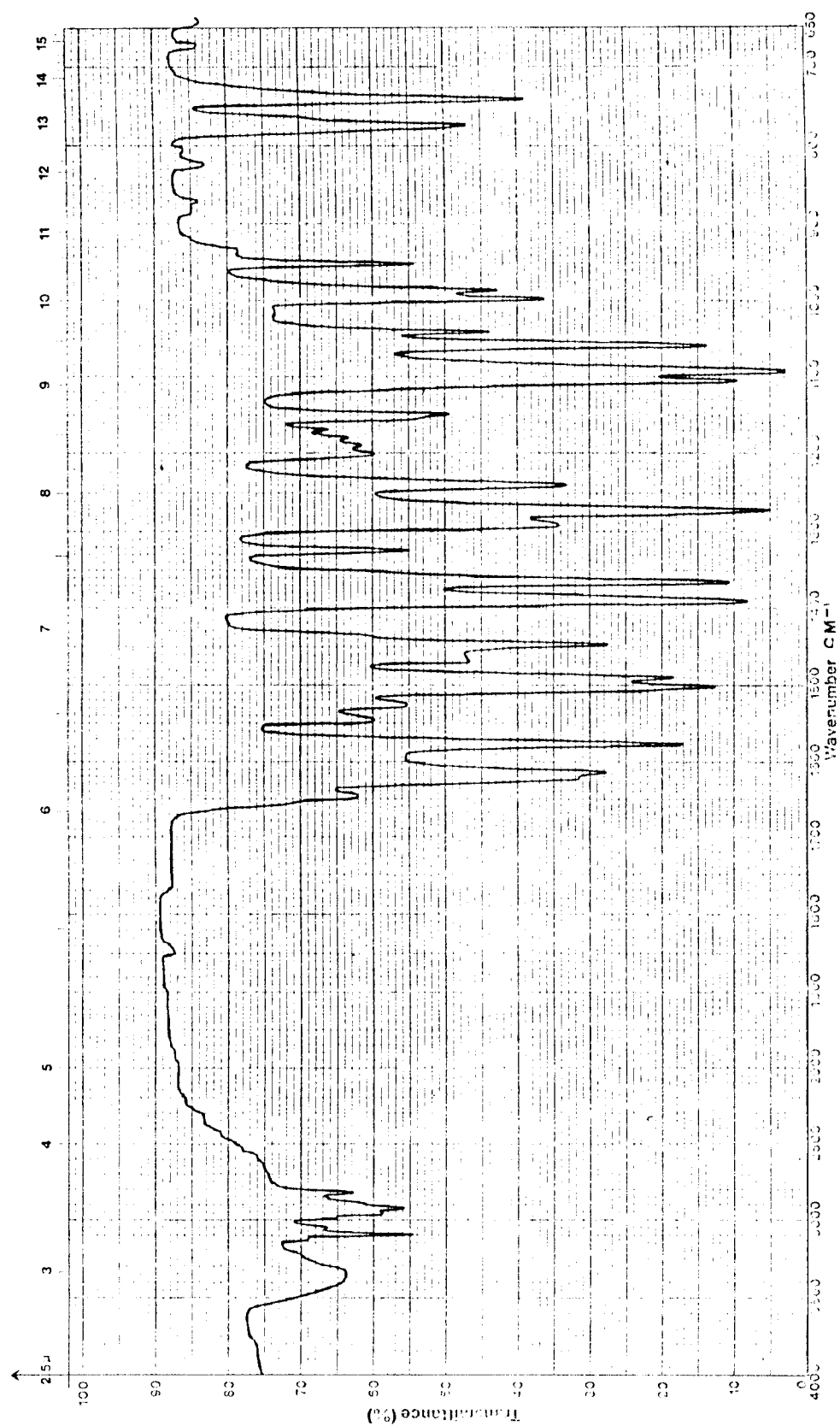


Figura 13 - Composto ZA4 - Espectro na região do infravermelho

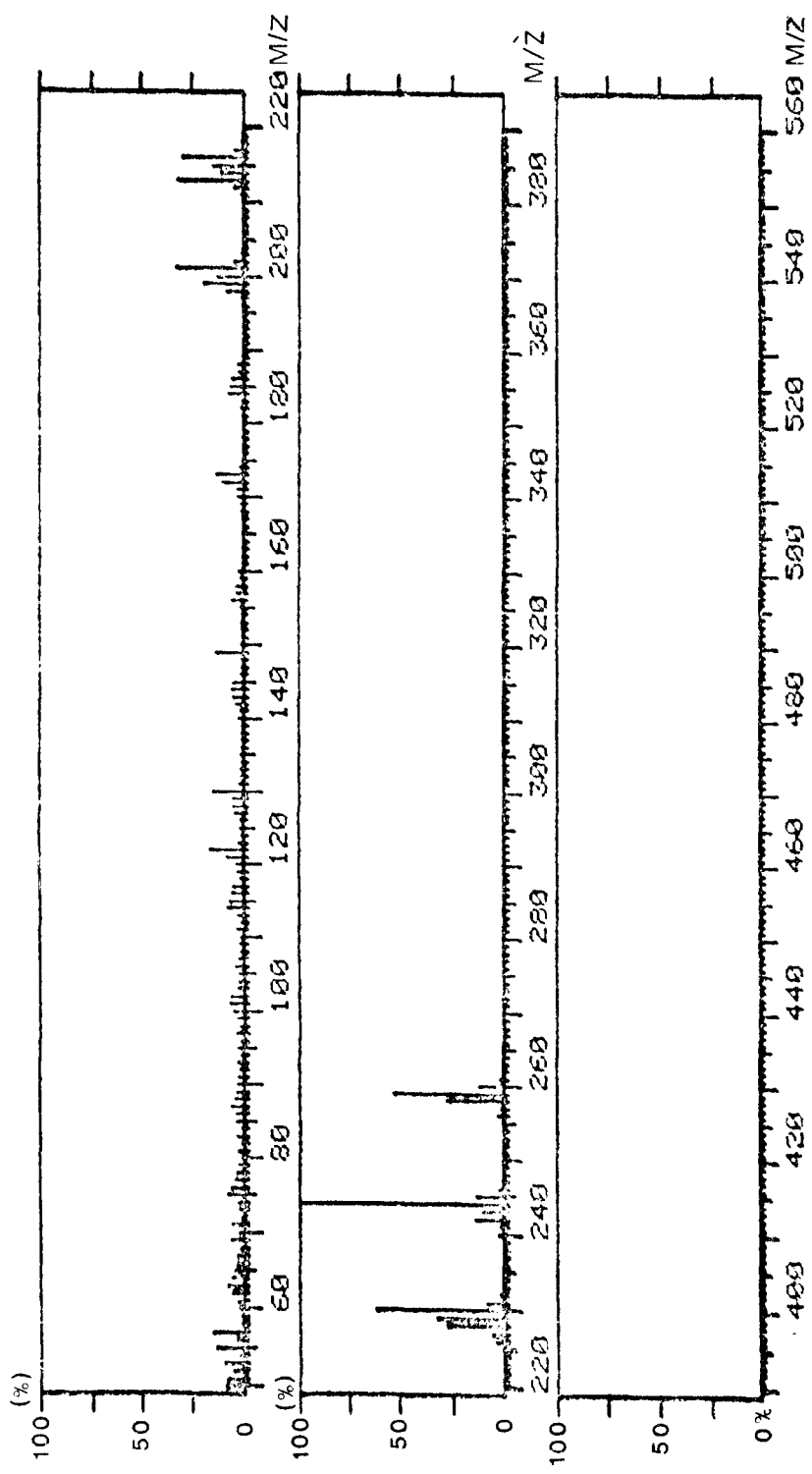
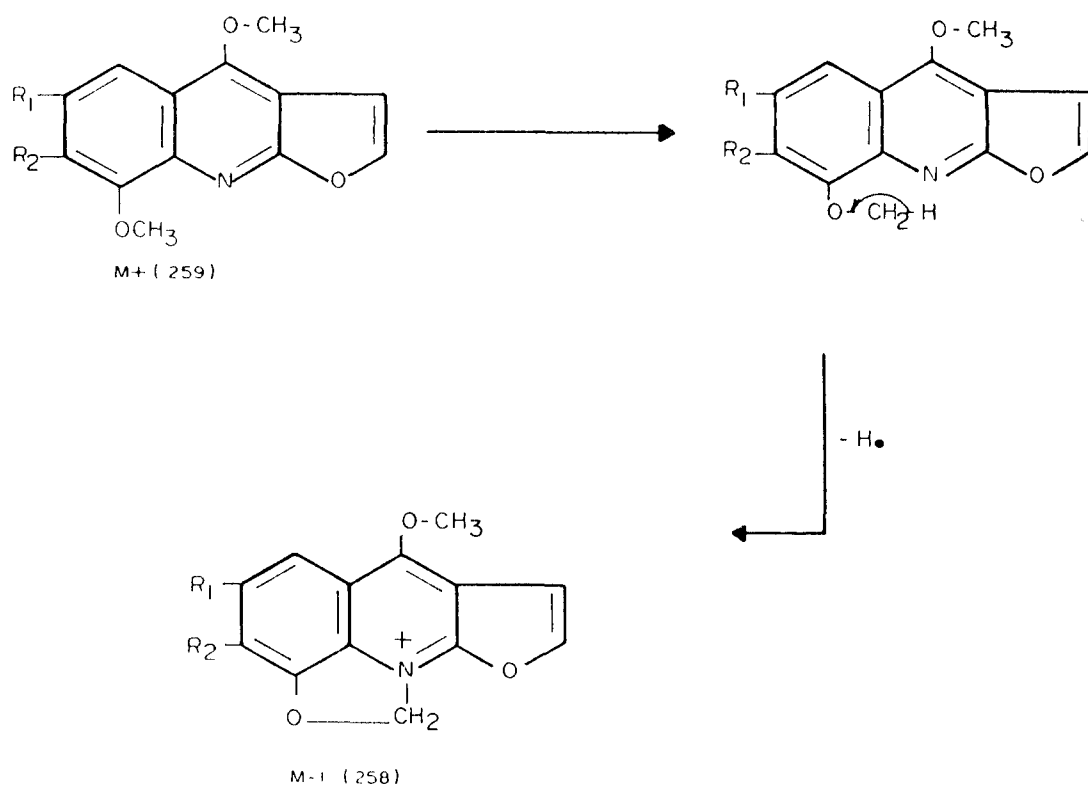


Figura 14 - Composto ZA4 - Espectro de massas por impacto eletrônico

Os picos M-1 e M-29, de forte intensidade são característicos de núcleo furoquinoleínico substituído na posição 8, o que elimina a estrutura da cocusaginina ($R_3 = H$).

O fragmento m/z 258 (esquema 4) é formado pela perda de um átomo de hidrogênio e tem sua carga estabilizada pelo par de elétrons do nitrogênio através de uma ligação carbono-nitrogênio.

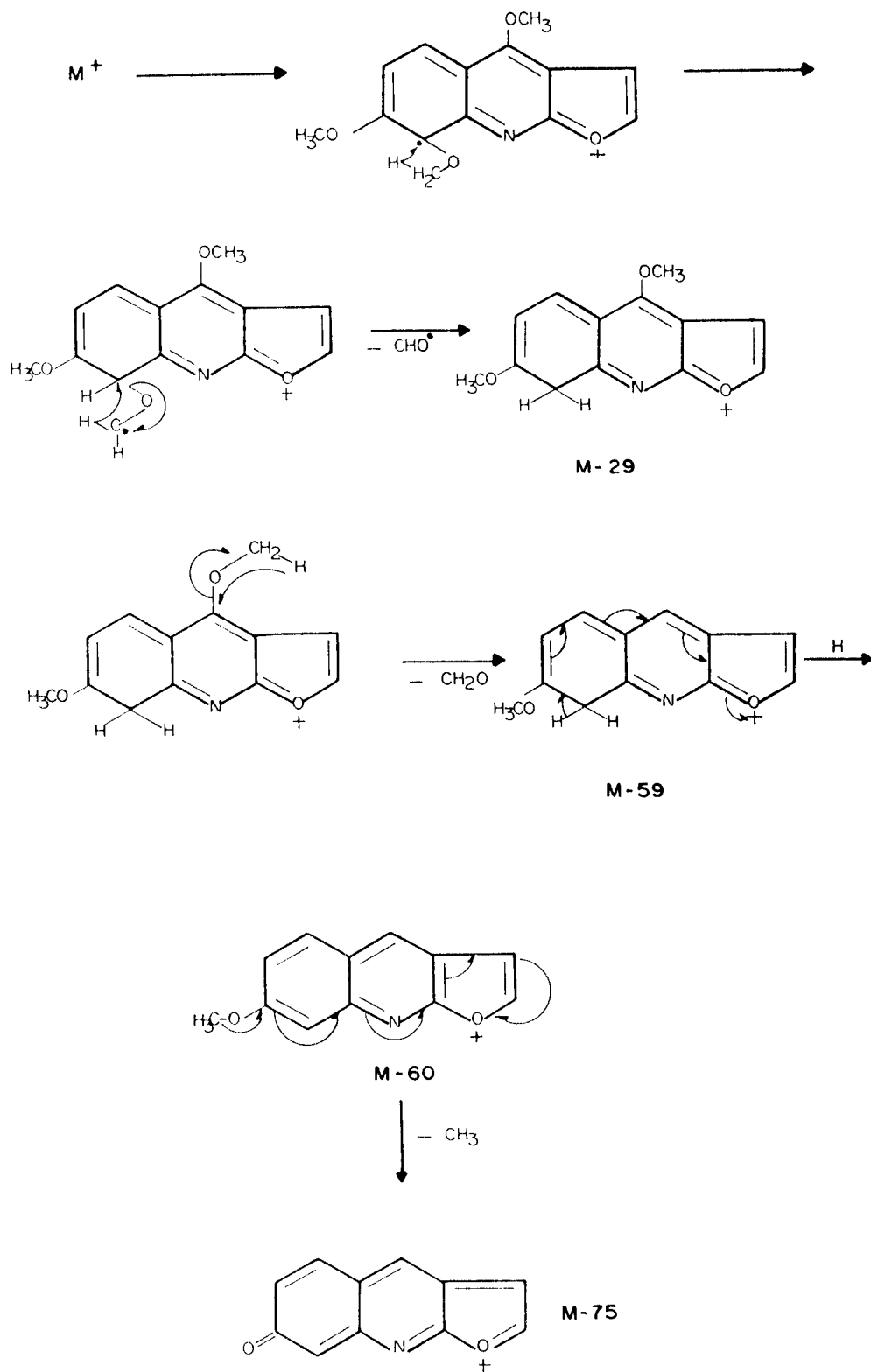


Esquema 4 - Composto ZA4: fragmentação no Espectrômetro de Massas.

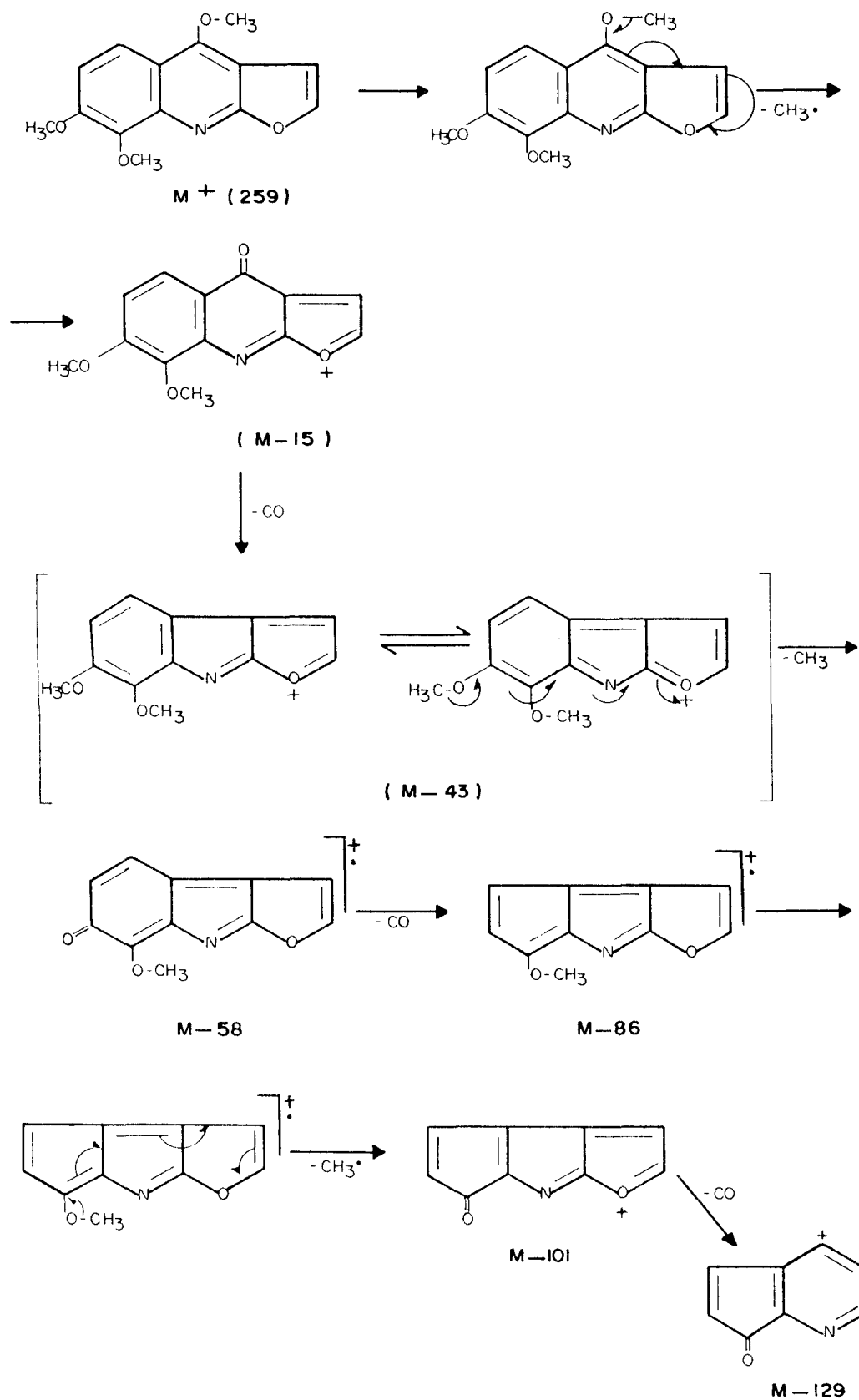
A formação do fragmento m/z 230 envolve o grupo metoxila da posição 8. Perdas sucessivas de 30 e 31 u.m.a. são oriundas do grupo metoxila da posição 4 e do radical hidrogênio do C-8. A partir do fragmento m/z 199, há a perda de radical metila do último grupamento metoxila (esquema 5).

O fragmento m/z 244 (100% de intensidade) é muito característico para a estrutura de esquimianina (CLUGSTON & MacLEAN, 1965), sendo formado pela perda do radical metila do grupamento metoxila na posição 4. Perdas subseqüentes de duas moléculas de monóxido de carbono envolvem o C-4 do anel quinoleínico e o sistema furano. O fragmento m/z 216 (M-43), da primeira perda de monóxido de carbono, é um híbrido de ressonância, o qual perde um grupo metila, formando um íon-radical (m/z 201). Este sofre perdas sucessivas de moléculas de monóxido de carbono, metila e monóxido de carbono, originando os fragmentos a m/z 173, 158 e 130, respectivamente (esquema 6) (CLUGSTON & MacLEAN, 1965).

Os dados espectrais, juntamente com o ponto de fusão ($178^0 - 180^0$ C), confirmaram para o alcalóide ZA4 a estrutura da esquimianina (IV.a) (BHATTACHARYYA et al., 1984).



Esquema 5 - Composto ZA4: fragmentações no Espectrômetro de Massas.



Esquema 6 - Composto ZA4: fragmentações no Espectrômetro de Massas.

3.1.2.5. Composto ZC1

O composto majoritário codificado como ZC1, isolado das raízes de *Zanthoxylum chiloperone*, apresentou ponto de fusão em 124⁰ - 125⁰ C.

No espectro na região do infravermelho (figura 15), a banda de absorção a 3486 cm⁻¹ caracterizou a deformação axial de O-H em ligação hidrogênio intermolecular, grupamento confirmado também pela presença de uma forte banda a 1110 cm⁻¹ (deformação de carbono-oxigênio), sendo este grupamento não fenólico (SILVERSTEIN et al., 1979).

A deformação axial de carbono-hidrogênio de metila apareceu como uma banda de absorção a 2971 cm⁻¹, e as deformações axiais assimétrica e simétrica da ligação carbono-oxigênio-carbono a 1257 e 1142 cm⁻¹, respectivamente (SILVERSTEIN et al., 1979). Uma forte banda a 1714 cm⁻¹ identificou a deformação axial da ligação dupla carbono-oxigênio de um núcleo α -pirano.

O espectro de massas (figura 16) apresentou o pico molecular a m/z 342, correspondente à fórmula C₂₀H₂₂O₅.

O pico de maior intensidade a m/z 327 (M-15) pode ser originado da perda de um dos radicais metila geminados no anel cromeno, o que resulta num íon muito estável (esquema 7) (BUDZIKIEWICZ et al., 1964). A formação deste

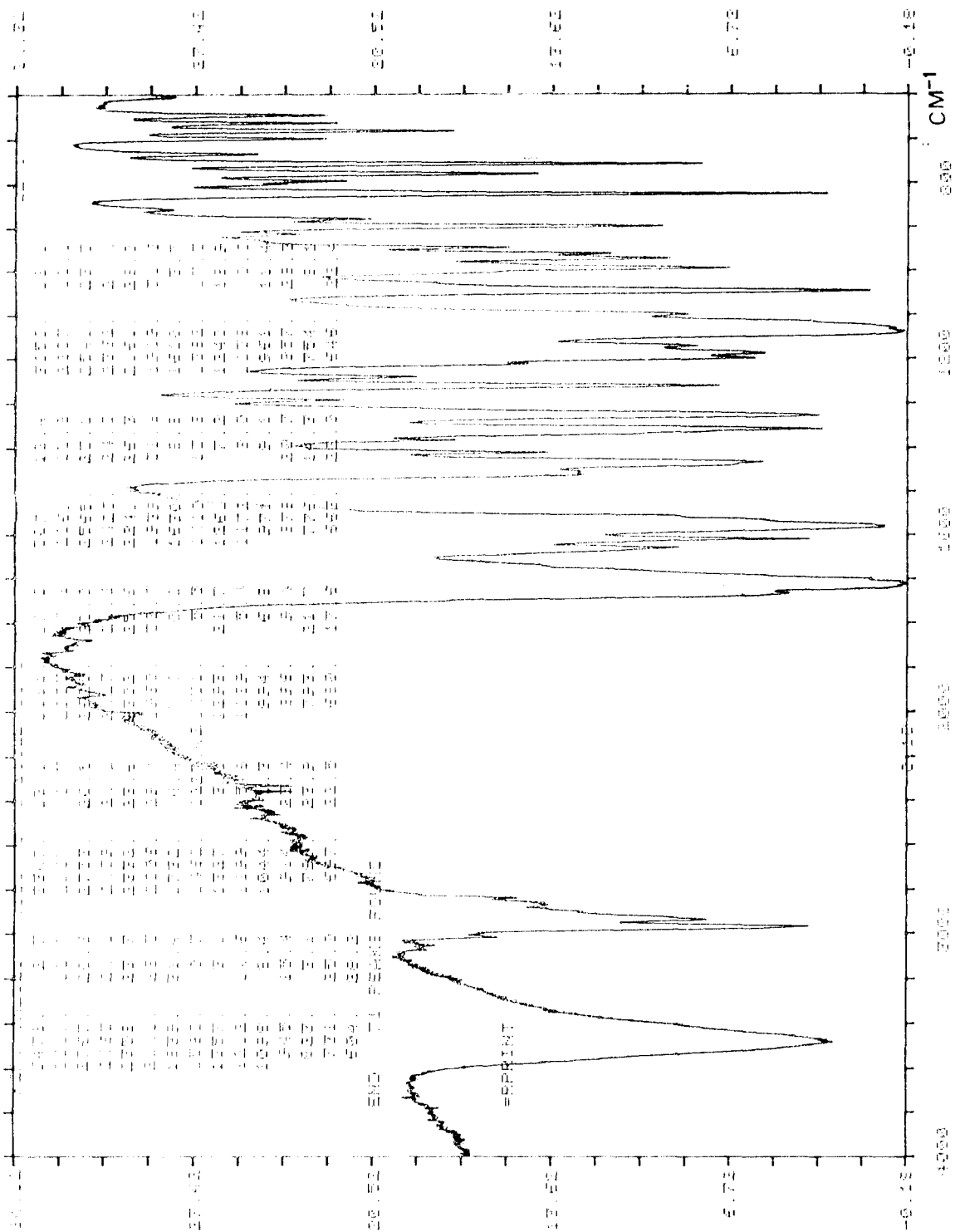


Figura 15 - Composto ZCl - Espectro na região do infravermelho

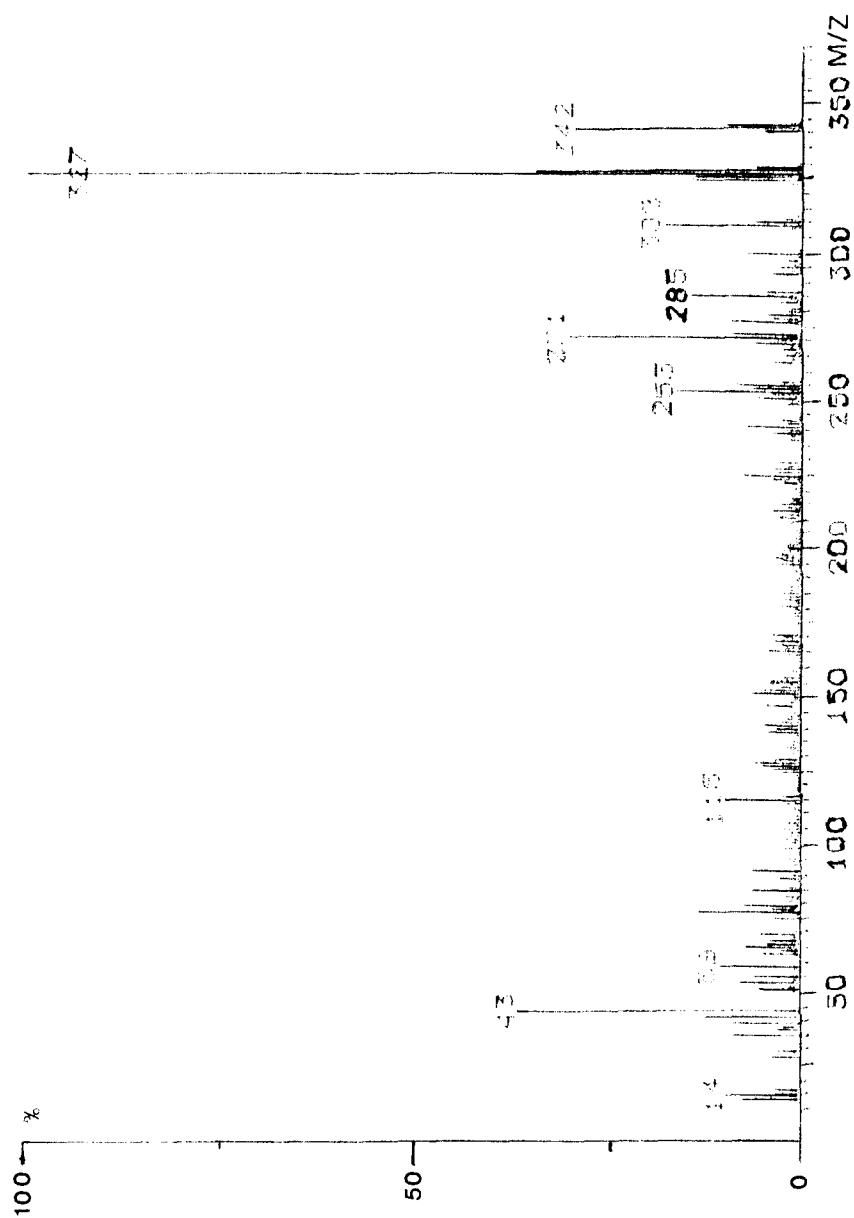


Figura 16 - Composto ZC1 - Espectro de massas por impacto eletrônico

fragmento também pode ser devida a perda da metila do grupo metoxila.

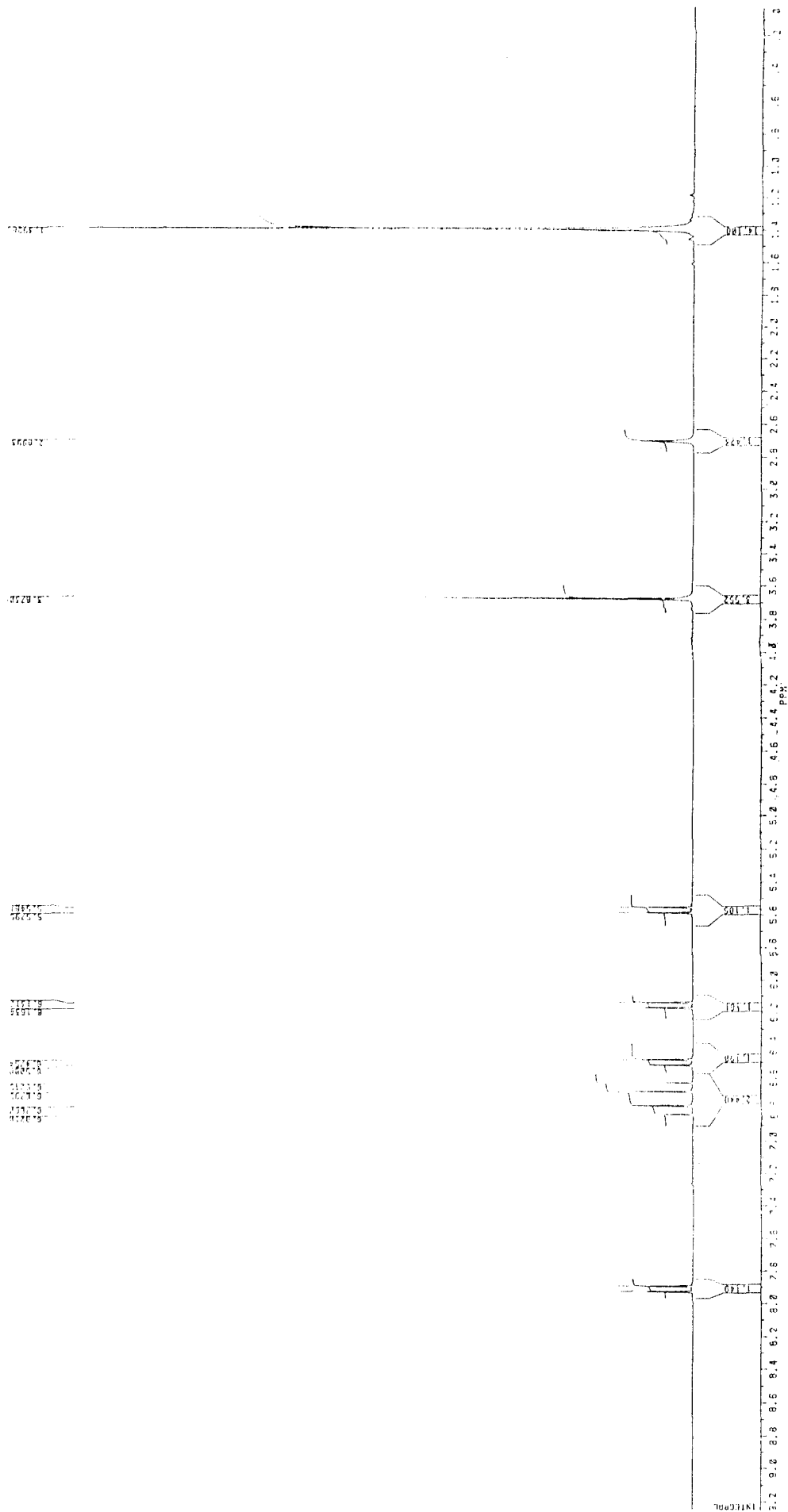
Perdas sucessivas de partículas neutras de monóxido de carbono, permitiram propor para o íon molecular $C_{20}H_{22}O_5$ a estrutura de uma cumarina, substituída nas posições 5, 6, 7 e 8 (esquema 7), cujos substituintes foram observados no espectro infravermelho (figura 15). Estes dados foram confirmados através de comparação com dados de literatura para o avicenol (GRAY et al., 1975; MURRAY & FORBES, 1978).

O espectro de ressonância protônica (figura 17) mostrou um sinal simples de intensidade 12 em δ 1,39, indicando a presença dos quatro substituintes metílicos; sinais simples a δ 2,70 e 3,67 indicaram o grupo hidroxílico na posição 3" e o grupo metoxílico na posição 7, respectivamente.

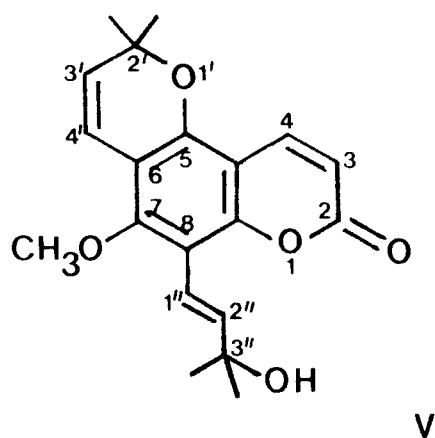
Os prótons dos carbonos 3 e 4 apareceram como sinais duplos a δ 6,15 ($J=9,67$ Hz) e 7,90 ($J=9,67$ Hz). Os prótons do núcleo cromeno mostraram dubletos a δ 5,56 ($H_{3'}$, $J=10,02$ Hz) e 6,49 ($H_{4'}$, $J=10,02$ Hz). A posição destes prótons foi confirmada por dados de literatura (STECK & MAZUREK, 1972).

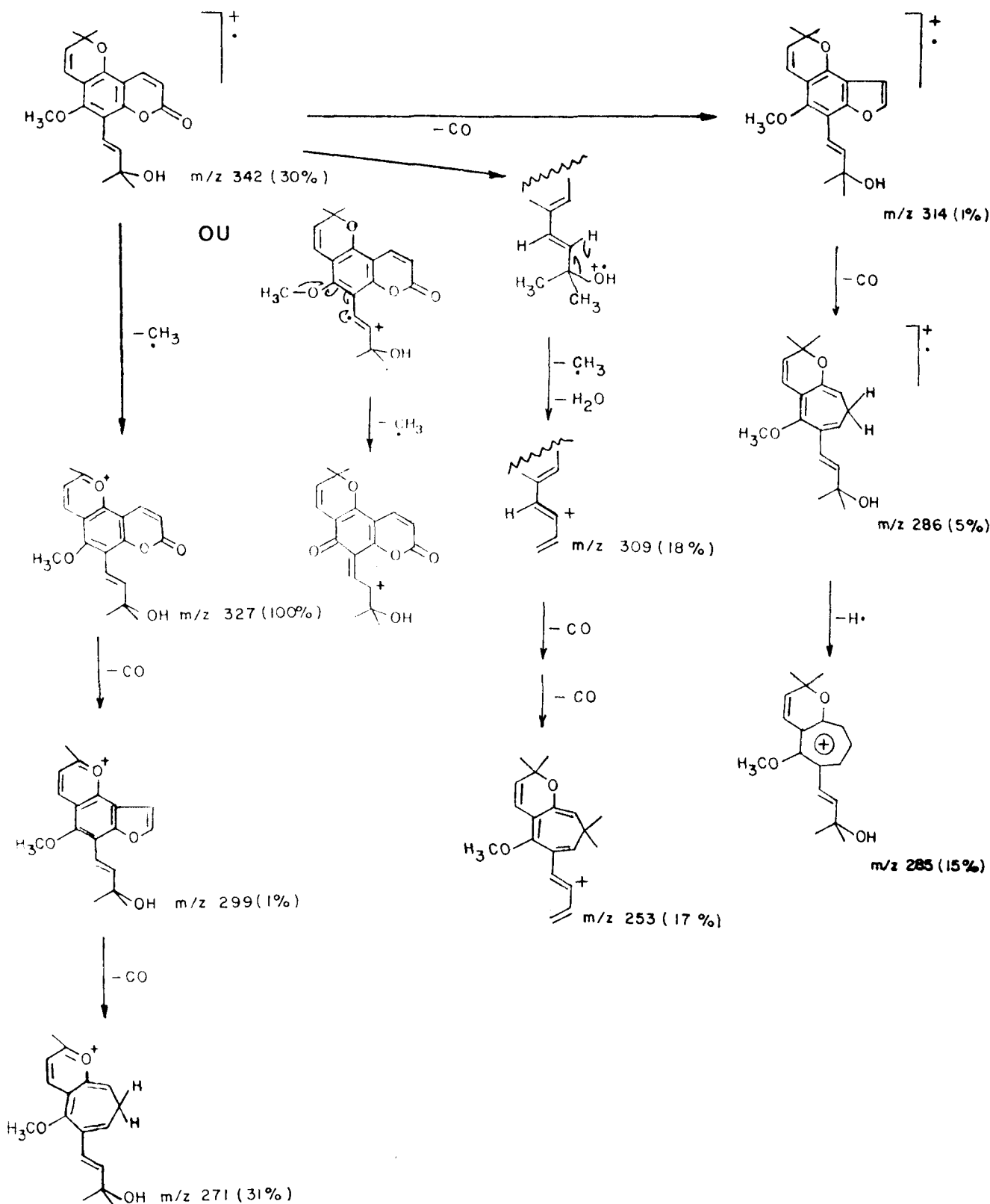
Os prótons $H_{1''}$ (δ 6,79) e $H_{2''}$ (δ 6,65) apresentaram-se como um sistema AB, com constante de acoplamento de 16,50 Hz, característica para prótons em posição trans (GRAY et al., 1975; SILVERSTEIN et al., 1979; SUWANBORIRUX et al., 1987).

Figura 17 - Composto ZC1 - Espectro de ressonância magnética protônica



Estes dados espectroscópicos, juntamente com os espectros no infravermelho e de massas, permitiram sugerir para a cumarina ZC1 a estrutura do trans-avicenol (V) (GRAY et al., 1975).





Esquema 7 - Composto ZCl: fragmentações em Espectrômetro de Massas.

3.1.2.6. Composto ZC2

O sólido codificado como ZC2, isolado das raízes de **Zanthoxylum chiloperone**, apresentou ponto de fusão em $141^0 - 142^0$ C.

O pico a m/z 324 no espectro de massas por ionização química (CH_4) (figura 18) foi compatível com a fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$.

O espectro de ressonância magnética protônica (figura 19) definiu a presença de 22 prótons. A ocorrência de um sistema AB em δ 6,24 ($J=9,68\text{Hz}$) e 7,99 ($J=9,69\text{Hz}$) confirmou a presença de um anel lactona- α,β -insaturada como o núcleo cumarínico.

Um segundo sistema AB a δ 5,64 ($J=10,02\text{Hz}$) e 6,59 ($J=10,02\text{Hz}$) e um sinal simples para grupos metílicos geminados a 1,46 ppm indicaram a presença de anel 2,2-dimetilcromeno encontrado em pirano-cumarinas (GRAY et al., 1975). O sinal simples de intensidade 3 a 3,75 ppm indicou o grupo substituinte metoxila.

A contagem de prótons restantes requer um substituinte C_5H_7 . Um sistema AB a δ 6,71 ($J=16,54\text{Hz}$) e 7,37 ($J=16,54\text{Hz}$) é característico para uma olefina dissustituída trans. O deslocamento em campo baixo sugere que este grupo olefínico é parte de um sistema estirenóide. Isto estabelece a estrutura parcial $-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}^-$, sendo que o resíduo C_2H_5 deve ser um grupo metílico e um metileno olefínico. Estes grupamentos foram confirmados pelo espectro

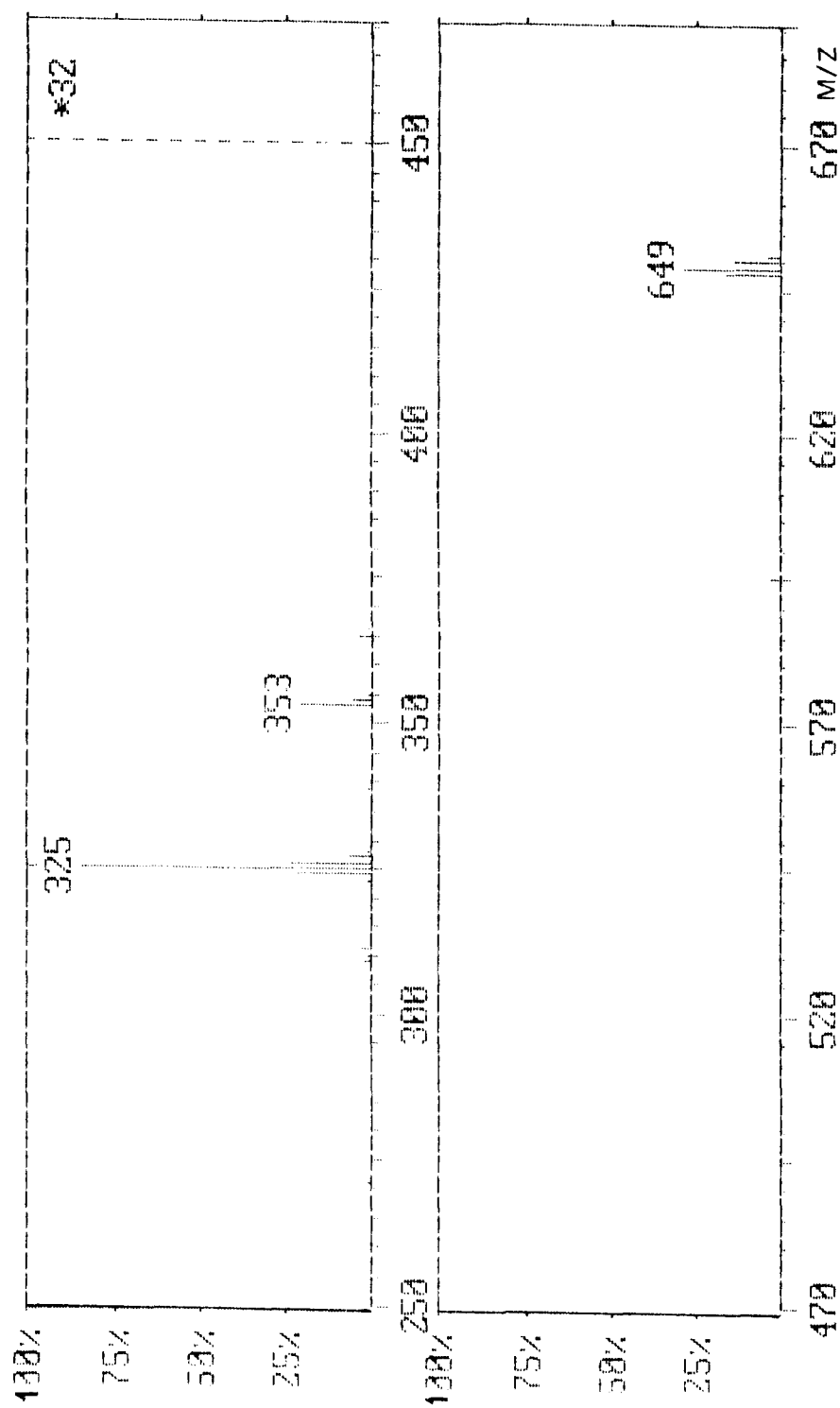


Figura 18 - Composto ZC2 - Espectro de massas por ionização química (CH₄)

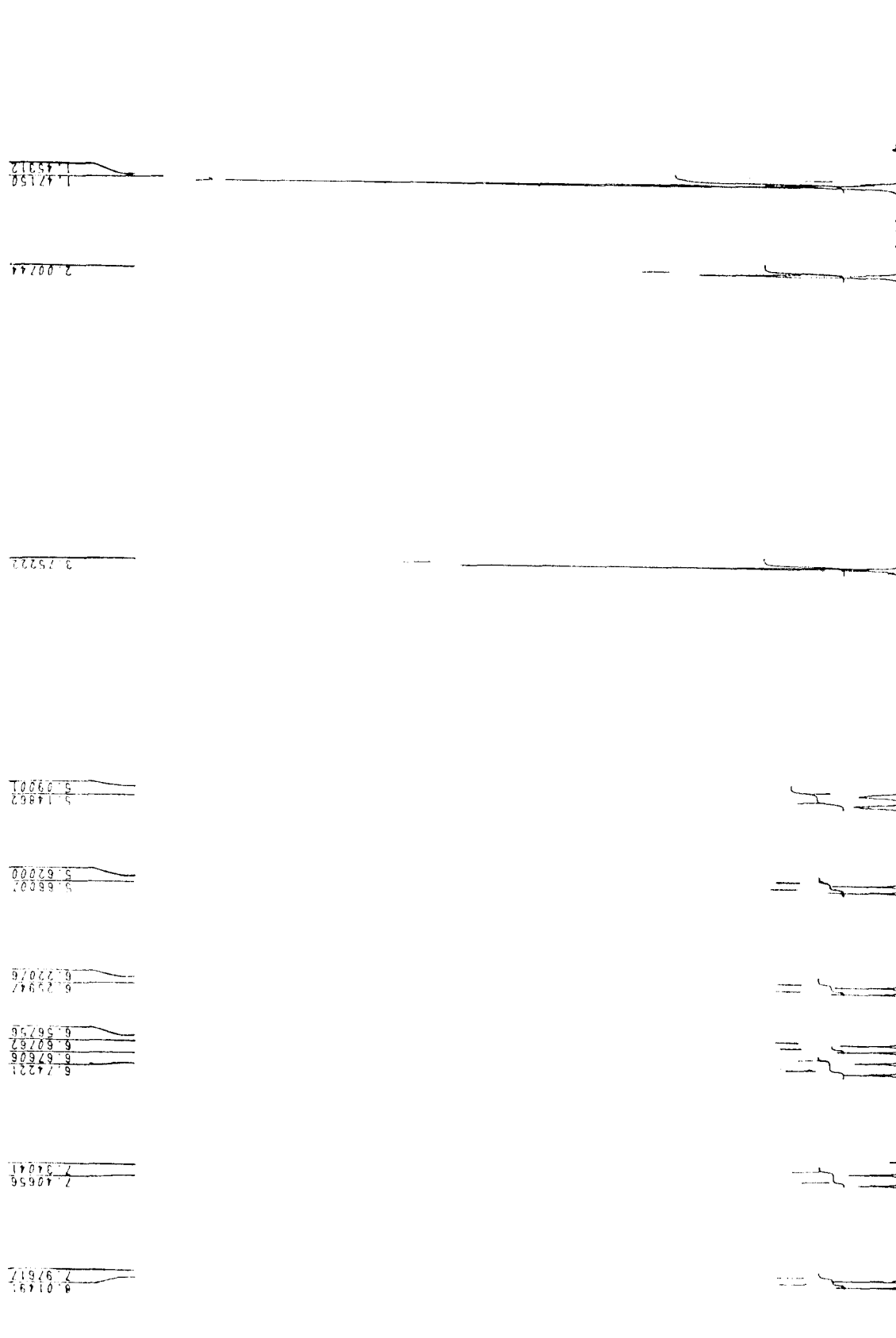


Figura 19 - Composto ZC2 - Espectro de ressonância magnética protônica

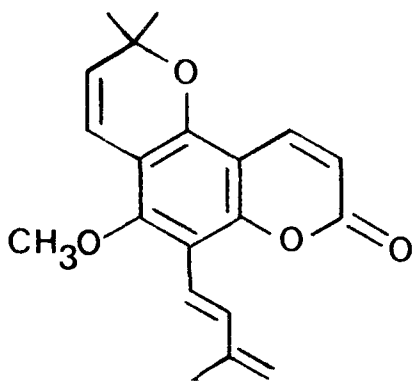
de ressonância, onde o grupo =CH₂ apareceu como um sinal duplo largo δ 5,12 devido a um fraco acoplamento com o grupo -CH₃ (sinal simples a δ 2,01) (ARTHUR & OLLIS, 1963).

O espectro de ressonância magnética de ¹³C (figura 20) confirmou a presença de vinte carbonos. As metilas geminadas (C-5' e C-6') do anel cromeno apareceram a 28,04 ppm; a metila C-5" do grupamento olefínico mostrou sinal a 18,35 ppm. O grupamento olefínico teve sua conformação comprovada pelos deslocamentos dos carbonos: C-1" a 136,39 ppm, C-2" a 117,18 ppm, C-3" a 149,34 ppm e C-4" a 116,45 ppm (WEHRLI & NISHIDA, 1979).

Os carbonos 2, 3, 4, 7, 8, 9 e 10 tiveram sinais a 160,74; 112,86; 138,36; 157,22; 111,62; 152,69 e 110,82 ppm, respectivamente, compatíveis com o núcleo α -pirona (CHANG et al., 1977).

Os carbonos 5, 6, 2', 3' e 4' apresentaram deslocamentos a 142,98; 106,29; 77,93; 129,29 e 117,72 ppm, característicos para a estrutura do anel cromeno substituído nas posições 5 e 6 do núcleo cumarínico (SUWANBORIRUX et al., 1987).

A análise destes dados permitiu sugerir para a cumarina ZC2 a estrutura da trans-avicenina (VI).



VI

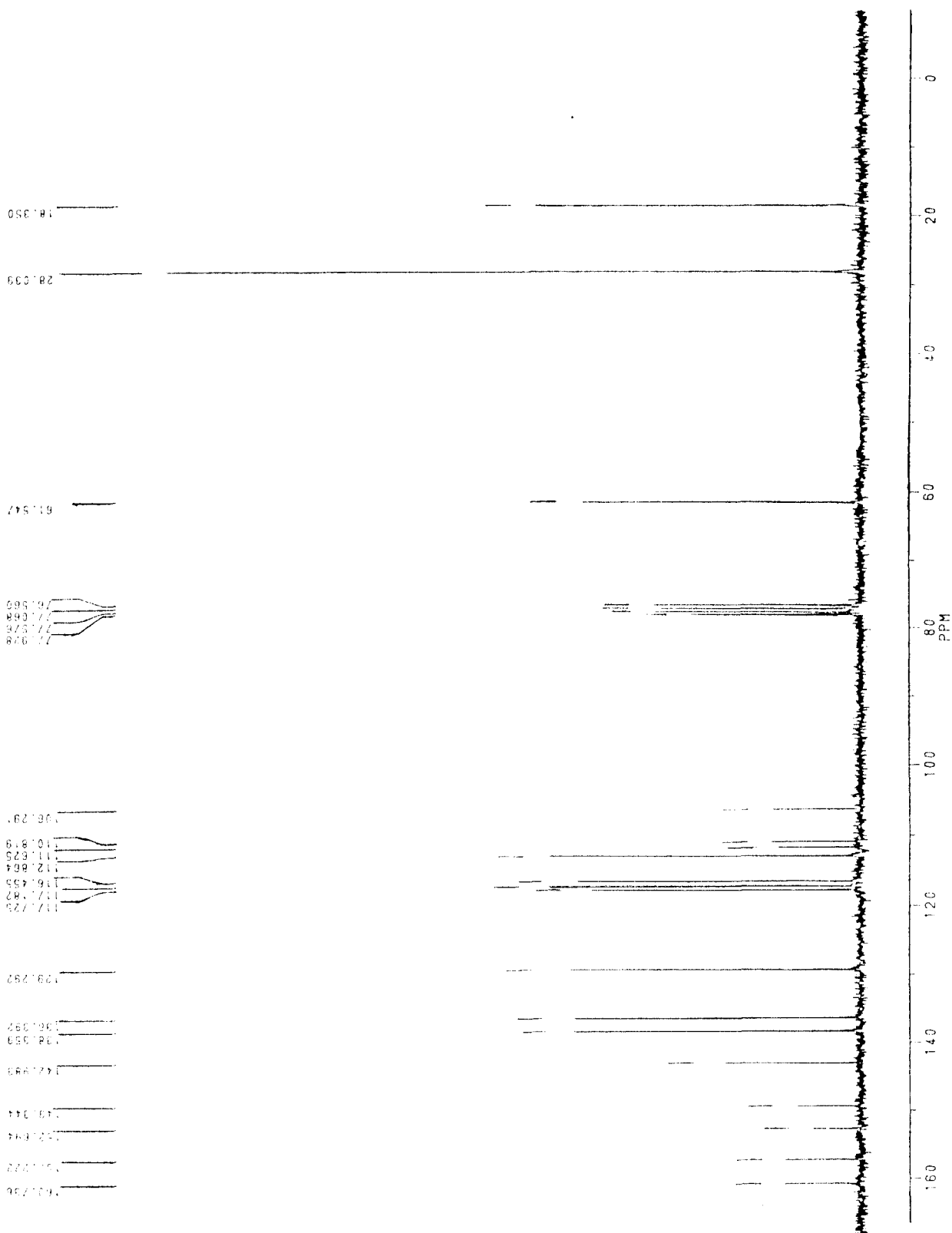


Figura 20 - Composto ZC2 - Espectro de ressonância magnética de ^{13}C

3.1.2.7. Composto ZC3

O sólido codificado como ZC3 e isolado das folhas de *Zanthoxylum chiloperone*, apresentou ponto de fusão em 77° - 80° C.

O seu espectro na região do ultravioleta apresentou dois máximos a 247 e 322 nm (metanol), característicos para cumarinas substituídas na posição 7 (MURRAY et al., 1982).

O espectro na região infravermelho (figura 21) apresentou bandas de absorção a 3460 e 1130 cm^{-1} , correspondentes às deformações da ligação O-H do grupamento hidroxílico não fenólico. A banda em 2930 cm^{-1} caracterizou a presença de grupamentos metílicos. Uma absorção forte em 1710 cm^{-1} confirmou o núcleo α -pirona-cumarínico (deformação axial da ligação dupla carbono-oxigênio). Uma banda em 1620 cm^{-1} identificou a deformação axial da ligação dupla carbono-carbono de éteres vinílicos (SILVERSTEIN et al., 1979); a ligação alquil-aril-éter foi confirmada pela presença de uma absorção em 1280 cm^{-1} , característica da deformação axial assimétrica de carbono-oxigênio-carbono.

O espectro de massas (figura 22) apresentou dois picos de forte intensidade, os quais caracterizaram a fácil perda de um fragmento $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$, produzindo o pico base a m/z 162. Perdas subsequentes de monóxido de carbono e hidrogênio a partir do íon a m/z 162, produziram os fragmentos a m/z 134, 133, 105 e 77 (esquema 8). O fragmento a m/z 85 foi originado da quebra da cadeia lateral, cuja perda posterior

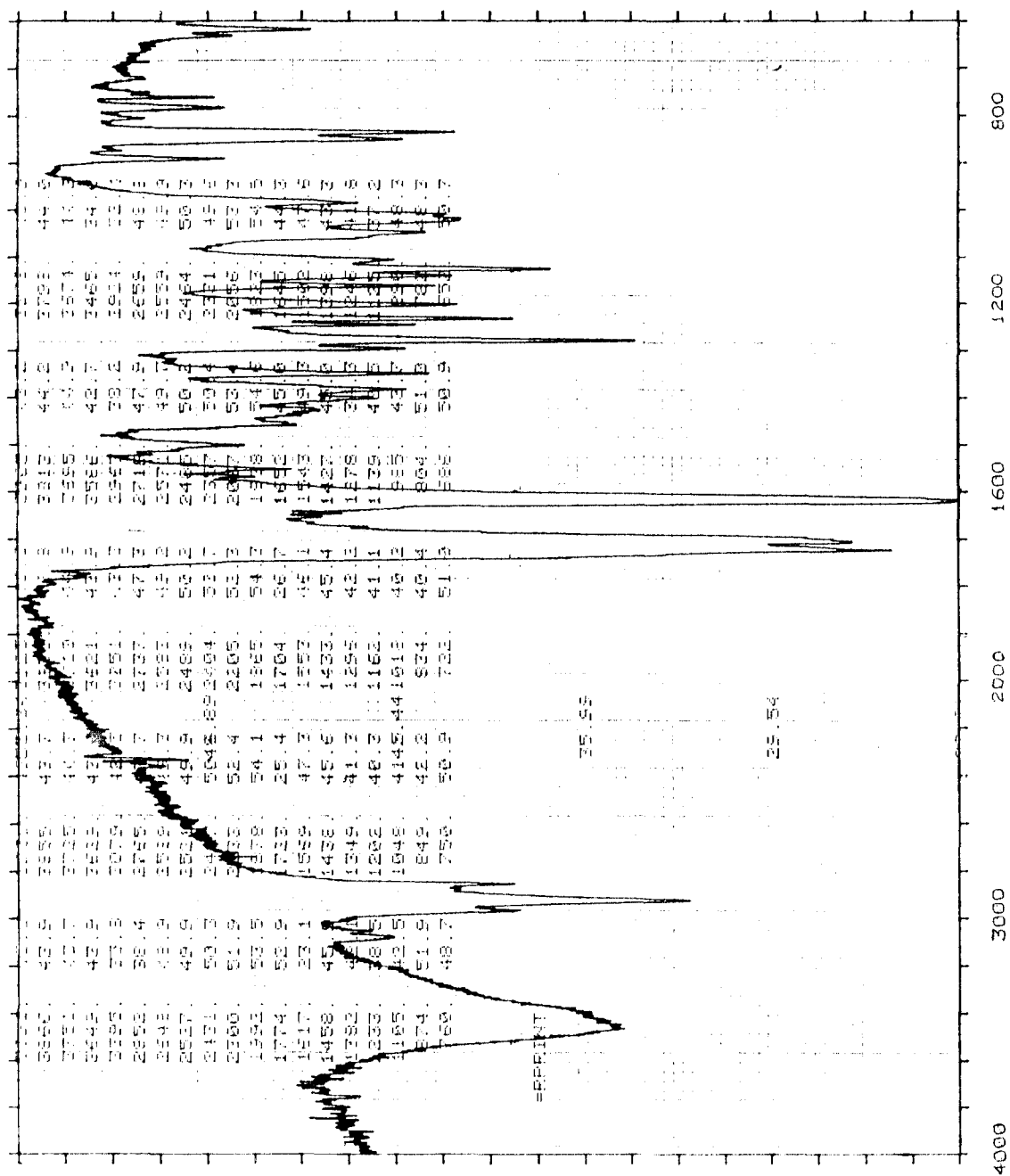


Figura 21 - Composto ZC3 - Espectro na região do infravermelho

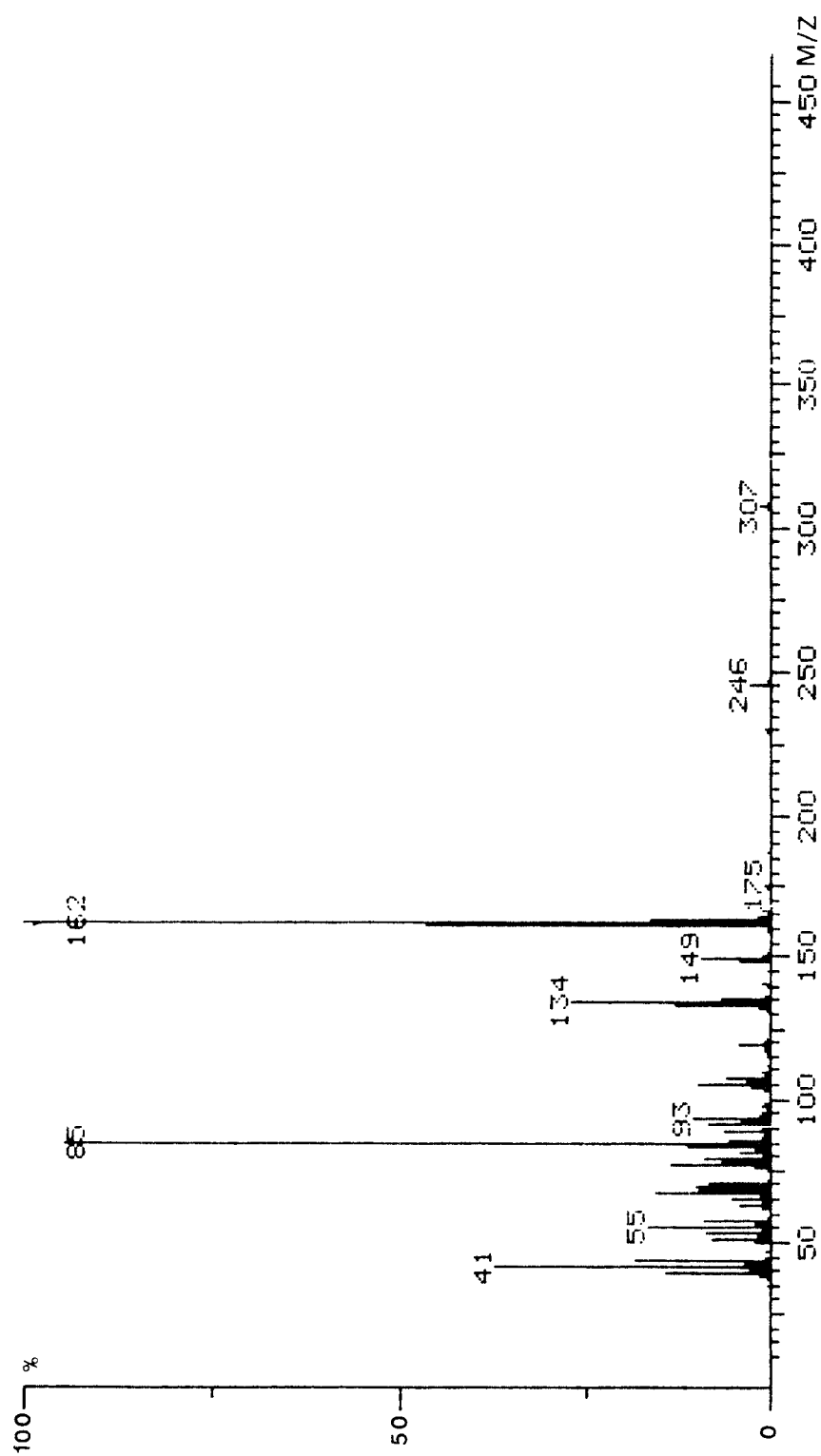
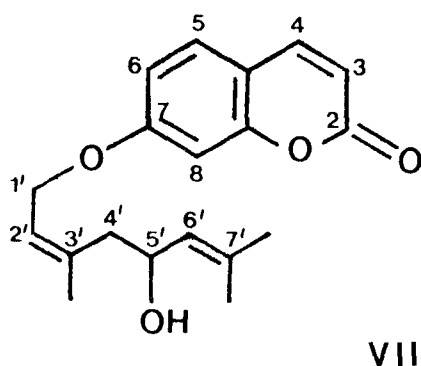


Figura 22 - Composto ZC3 - Espectro de massas por impacto eletrônico

de uma molécula de água produziu o fragmento a m/z 67. Estes dados espectrais permitiram propor para o composto ZC3 a estrutura de uma O-cumarina, substituída na posição 7 por uma cadeia de 10 carbonos.

Os espectros de ressonância magnética protônica (figura 23) e de ^{13}C (figura 24), dados apresentados na tabela 4, foram compatíveis com a estrutura da anisocumarina H (VII) para o composto ZC3 (STECK & MAZUREK, 1972; CUSSANS & HUCKERBY, 1975; NGADJUI et al., 1989).



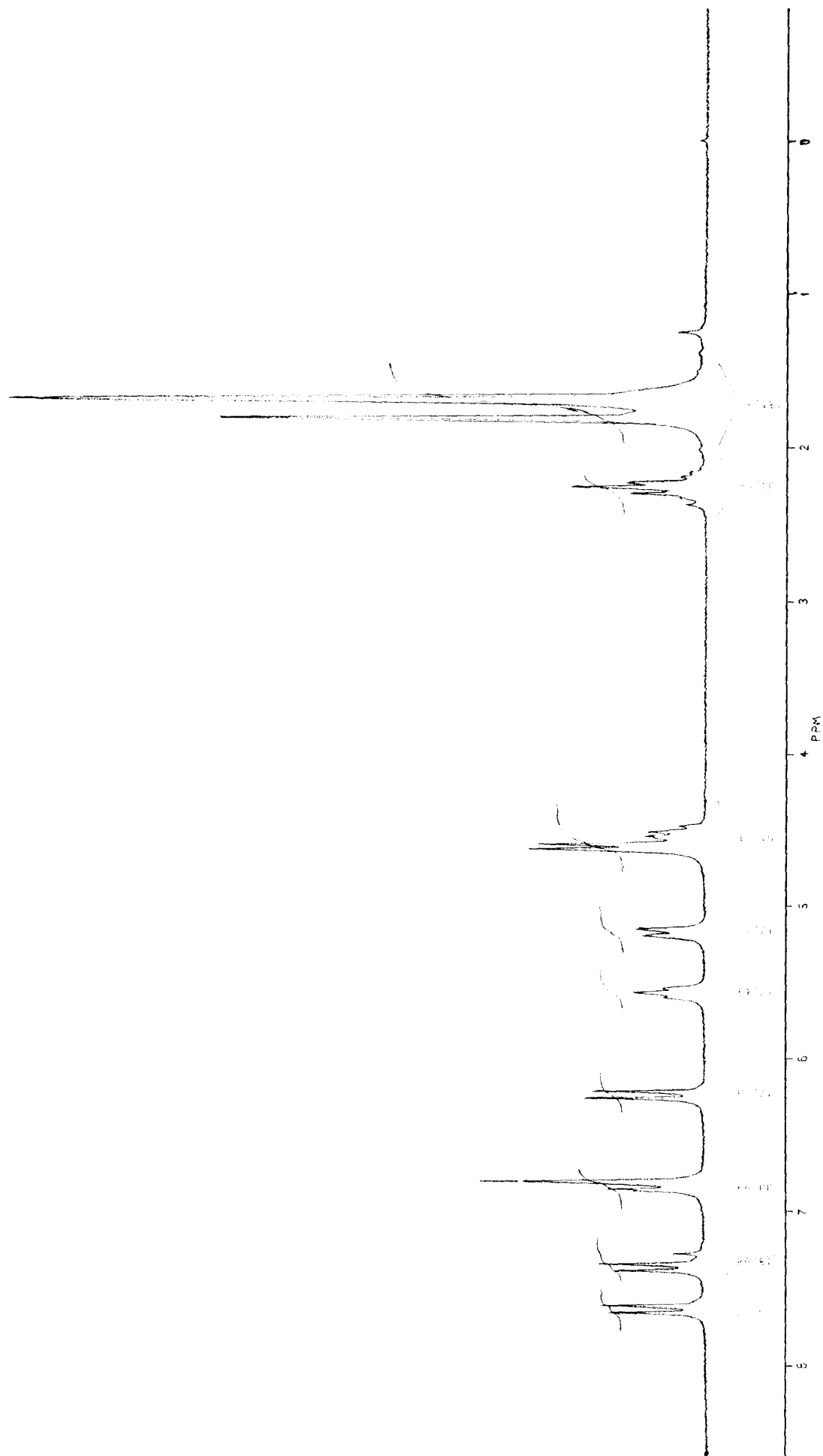


Figura 23 - Composto ZC3 - Espectro de ressonância magnética protônica

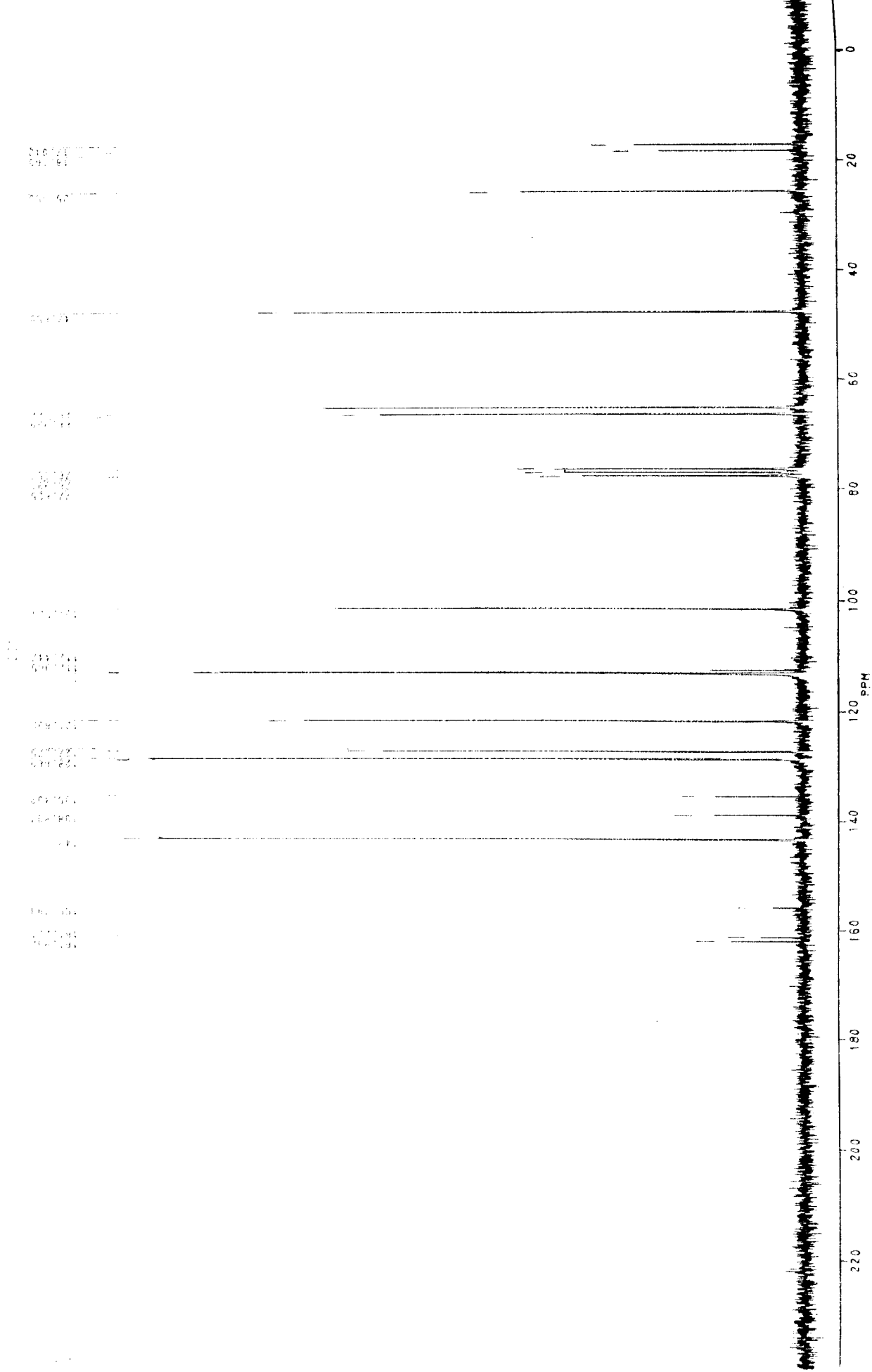
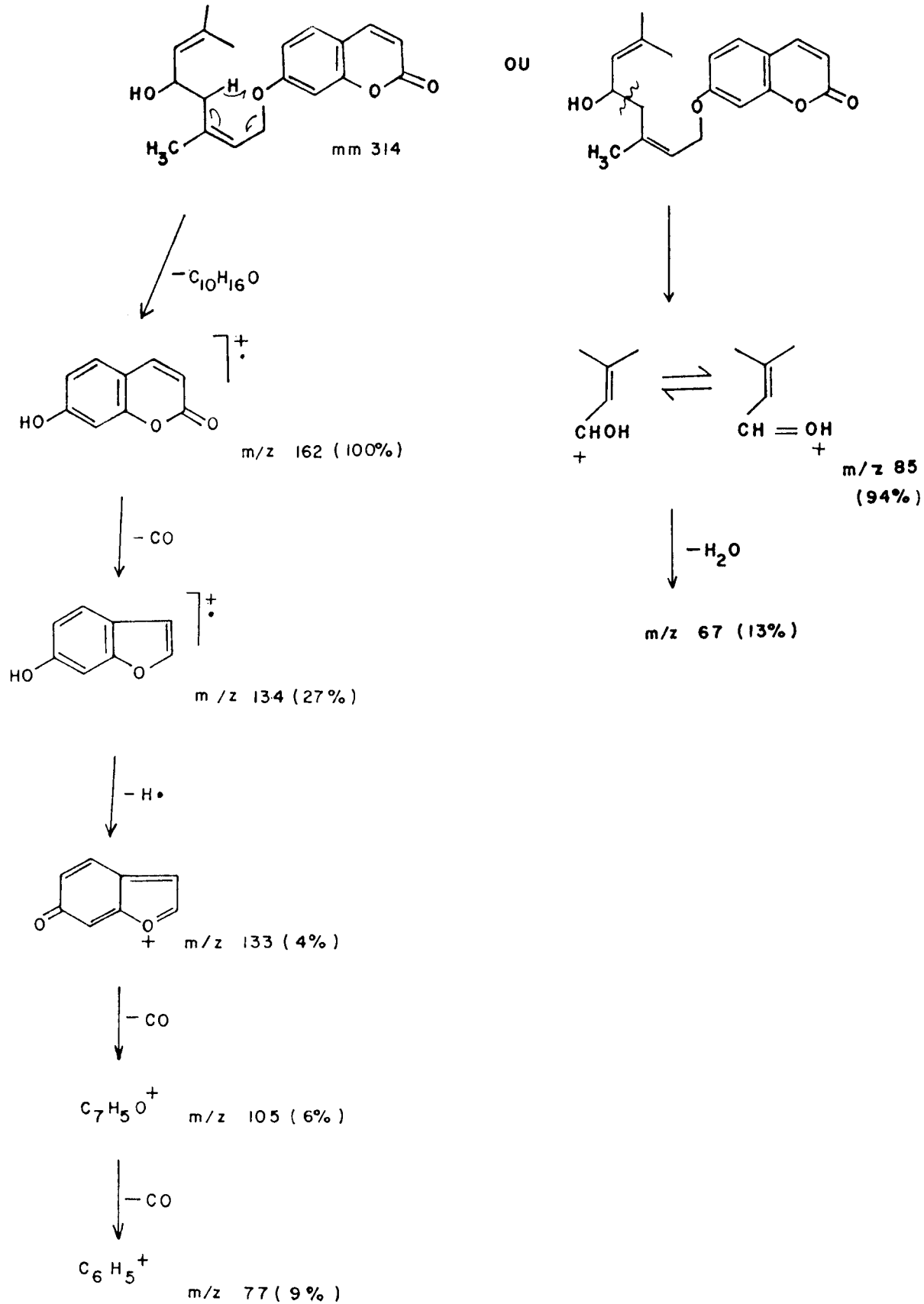


Figura 24 - Composto ZC3 - Espectro de ressonância magnética de ^{13}C

Tabela 4 - Dados espectrais de RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃) e de RMN-¹³C (75,47 MHz, CDCl₃) para o composto ZC3.

POSIÇÃO	¹³ CRMN δ	¹ HRMN δ	J (Hz)
C-2	161,20	--	--
C-3/H-3	112,96	6,25 d	9,49
C-4/H-4	143,37	7,64 d	9,46
C-4a	112,45	--	--
C-5/H-5	127,27	7,37 d	8,29
C-6/H-6	113,11	6,83 dd	8,91; 2,26
C-7	161,93	--	--
C-8/H-8	101,52	6,86 d	2,26
C-8a	155,79	--	--
C-1'/H-1'	65,17	4,62 d	6,39
C-2'/H-2'	128,67	5,57 tq	6,39; 5,38
C-3'	138,84	--	--
C-4'/H-4'	47,65	2,27 m	8,22; 5,83
C-5'/H-5'	66,33	4,55 dd	11,85; 5,58
C-6'/H-6'	121,69	5,18 d	8,51
C-7'	135,40	--	--
3'-CH ₃	17,04	1,83 s	--
7'-CH ₃	25,65	1,70 s	--
	18,16	1,70 s	--
OH	--	1,70 s	--



Esquema 8 - Composto ZC1: fragmentações em Espectrômetro de Massas.

3.2. ANÁLISE BIOLÓGICA

3.2.1. Cromoteste SOS - Teste de genotoxicidade em sistema procariótico

A avaliação da função SOS é feita pelo fator de indução, que expressa a desrepressão do gene **sulA**, entre outros. Fatores de indução menores do que dois, indicam que não houve indução significativa da função SOS.

As curvas dose-resposta do fator de indução pela concentração apresentam uma porção linear, cuja inclinação é chamada de potência indutora SOS (SOSIP). A SOSIP, dada para cada substância é uma expressão quantitativa da capacidade de induzir a resposta do operon **sulA::lacZ** em **E.coli**.

A sensibilidade do cromoteste SOS é definida como a menor concentração da substância, em nmol, capaz de induzir uma resposta que seja o dobro do resultado obtido com a concentração zero da substância.

Os controles positivos nos testes sem e com metabolização, utilizando 4-nitroquinoleína e aflatoxina B1 respectivamente, apresentaram fatores de indução (tabela 5) compatíveis com dados de literatura (QUILLARDET et al., 1982a; VON POSER et al., 1990).

A resposta do alcalóide ZA2, 5-metoxicantin-6-ona, na ausência e na presença do agente de metabolização está apresentada na tabela 5 e figura 25.

Tabela 5 - Atividade indutora da 5-metoxicantin-6-ona sobre a função SOS, na cepa PQ37 de *E. coli*, no cromoteste SOS sem e com metabolização (S9 induzida com Aroclor 1254).

SUBSTÂNCIA	CONCENTRAÇÃO ng/teste	UNIDADES ^b β -gal Pase		$\frac{U\beta\text{-gal}}{UPase}$	FATOR DE INDUÇÃO
4-NQO ^a	0	314	2978	0,105	1,00
	10	1087	2934	0,370	3,52
	100	4159	2702	1,539	14,66
5-metoxi cantin-6-ona	0	314	2978	0,105	1,00
	5 x 10 ³	621	3311	0,187	1,78
	7,5 x 10 ³	596	3220	0,185	1,76
	1 x 10 ⁴	636	3164	0,201	1,91
	1,5 x 10 ⁴	791	2962	0,267	2,54
	2 x 10 ⁴	924	2703	0,342	3,26
	3 x 10 ⁴	932	2806	0,332	3,16
	4 x 10 ⁴	715	2675	0,267	2,54
AFB1 ^a	0	416	2579	0,161	1,00
	5	832	3099	0,268	1,66
	20	1931	2783	0,694	4,31
5-metoxi cantin-6-ona	0	416	2579	0,161	1,00
	5 x 10 ³	522	2330	0,224	1,39
	7,5 x 10 ³	572	2218	0,258	1,60
	1 x 10 ⁴	708	2089	0,339	2,10
	1,5 x 10 ⁴	914	2265	0,403	2,50
	2 x 10 ⁴	883	1792	0,493	3,06
	3 x 10 ⁴	1050	2169	0,484	3,01
	4 x 10 ⁴	983	1910	0,515	3,20

^a Controle positivo; ^b β -gal = β -galactosidase; Pase = fosfatase alcalina.

Verificou-se que nos testes realizados sem utilização de mistura de ativação metabólica, os fatores de indução apresentaram valores inferiores a dois nas concentrações de 5 x 10³, 7,5 x 10³ e 1 x 10⁴ ng/teste. As concentrações 1,5 x 10⁴, 2 x 10⁴, 3 x 10⁴ e 4 x 10⁴ ng/teste apresentaram fatores de indução iguais a 2,54, 3,26, 3,16 e 2,54 respectivamente, indicando um efeito genotóxico.

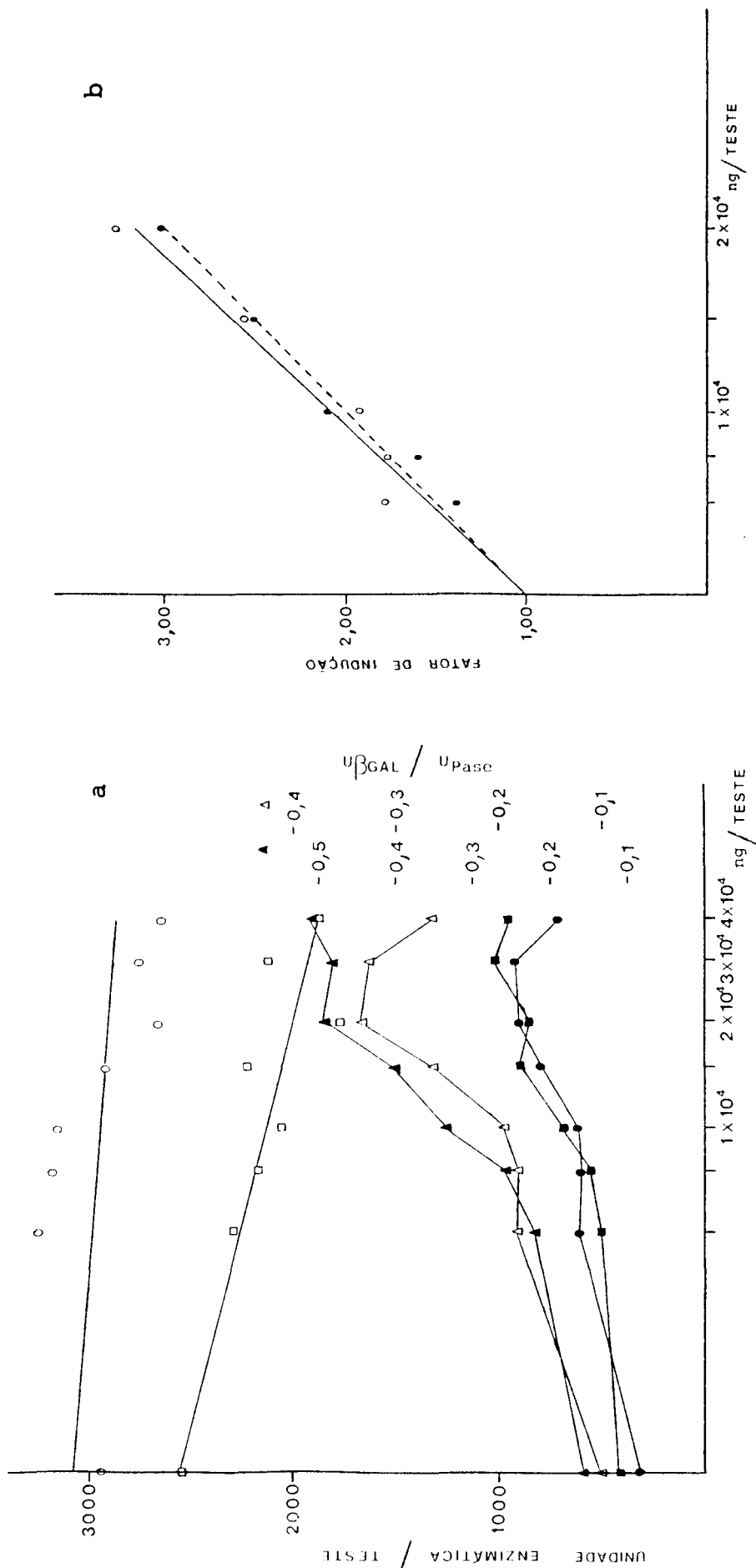


Figura 25 - Curvas dose-resposta no Cromoteste SOS para o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona.

- (a) . teste sem ativação metabólica: atividade da β -galactosidase (●); atividade da fosfatase alcalina (○); relação entre as duas atividades (U β Gal/UPase) (Δ).
- . teste com ativação metabólica: atividade da β -galactosidase (■); atividade da fosfatase alcalina (◻); relação entre as duas atividades (U β Gal/UPase) (▲).
- (b) A potência indutora SOS (SOSIP) é calculada através da inclinação da reta, obtida com as concentrações mais baixas, a partir do gráfico do valor normalizado da relação U β Gal/UPase (ou fator de indução).
- . sem ativação metabólica (○—○) ($\hat{y} = 1,0504 + 0,00010431x$; $r = 0,9688$)
- . com ativação metabólica (●—●) ($\hat{y} = 0,8472 + 0,00011155x$; $r = 0,9926$)

No teste com ativação metabólica, observou-se uma indução das funções SOS nas concentrações superiores a 1×10^4 ng/teste, sugerindo que os metabólitos de 5-metoxicantin-6-ona são agentes genotóxicos.

Comparando-se as potências indutoras SOS e as sensibilidades para os testes sem e com ativação metabólica, observou-se que as mesmas apresentaram valores muito próximos (SOSIP de $2,76 \times 10^{-2}$ e $2,78 \times 10^{-2}$, sensibilidades iguais a 37,6 e 40,0 nmol, respectivamente) (figura 25b), indicando que 5-metoxicantin-6-ona é um agente genotóxico direto.

3.2.2. Teste de Ames - Salmonella/microsoma

O alcalóide 5-metoxicantin-6-ona, testado pelo procedimento de incorporação nas linhagens TA98 e TA100, sem e com ativação metabólica, não apresentou o número de revertentes **HIS**⁺ induzidos significativamente diferente do número de revertentes **HIS**⁺ espontâneos do controle negativo, isto é, o Índice de Mutagenicidade (IM) não ultrapassou o dobro da atividade mutagênica do controle negativo. Também observou-se que, quando a atividade mutagênica foi avaliada pelo programa Salmonel, não houve um efeito dose-resposta significativo (valores $P \leq 5\%$) (Tabelas 6, 7, 8 e 9).

Tabela 6 - Indução de revertentes **HIS⁺** em cepa de **S. typhimurium** TA98, em ausência de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona.

DOSE (µg)	N ⁰ REVERTENTES			MÉDIA ± D.P.		IM ^a
0 ^b	17	15	11	14,33 ±	3,06	--
60	7	10	15	10,67 ±	4,04	0,74
80	8	5		6,50 ±	2,12	0,45
CP ^c	328	236	266	276,67 ±	46,92	19,31

a Índice de Mutagenicidade = $\frac{\text{revertentes induzidos}}{\text{revertentes espontâneos no CN}}$

b Controle negativo (CN); ^c Controle positivo.
 Mutação espontânea: 15,33 ± 4,72.

Análise estatística:

P Análise variância	9,1%	NS
Mod. aceitável (p)	Linear	(38,6%)
P dose-resposta	97,8	NS
Revertentes/µg	--	
Limite conf.	--	
Resultado	Negativo	

Tabela 7 - Indução de revertentes **HIS⁺** em cepa de **S. typhimurium** TA98, em presença de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona.

DOSE (µg)	N ⁰ REVERTENTES			MÉDIA ± D.P.		IM ^a
0 ^b	22	12	11	15,00 ±	6,08	--
60	17	14	15	15,33 ±	1,53	1,02
80	19	21	22	20,67 ±	1,53	1,38
CP ^c	1234	1350	1120	1234,67 ±	115,00	82,31

Mutação espontânea: 25,33 ± 4,04.

Análise estatística:

P Análise variância	28,1%	NS
Mod. aceitável (p)	Linear	(24,1%)
P dose-resposta	13,5%	NS
Revertentes/µg	--	
Limite conf.	--	
Resultado	Negativo	

Tabela 8 - Indução de revertentes **HIS⁺** em cepa de **S.typhimurium** TA100, em ausência de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona.

DOSE (μ g)	N ⁰ REVERTENTES			MÉDIA \pm D.P.		IM ^a
0 ^b	54	32	75	53,67	\pm 21,50	--
60	80	56	78	71,33	\pm 13,32	1,33
80	40	70	62	57,33	\pm 15,53	1,07
CP ^c	514	504	497	505,00	\pm 8,54	9,41

Mutação espontânea: 79,33 \pm 23,09

Análise estatística:

P Análise variância 51,9% NS
 Mod. aceitável (p) Linear (32,8%)
 P dose-resposta 29,3% NS
 Revertentes/ μ g --
 Limite conf. --
 Resultado Negativo

Tabela 9 - Indução de revertentes **HIS⁺** em cepa de **S.typhimurium** TA100, em presença de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona.

DOSE (μ g)	N ⁰ REVERTENTES			MÉDIA \pm D.P.		IM ^a
0 ^b	139	248	123	170,00	\pm 68,02	--
60	167	114	211	164,00	\pm 48,57	0,96
80	105	159	115	126,33	\pm 28,73	0,74
CP ^c	442	439	417	432,67	\pm 13,65	2,54

Mutação espontânea: 140,00 \pm 43,48.

Análise estatística:

P Análise variância 49,5% NS
 Mod. aceitável (p) Linear (48,3%)
 P dose-resposta 82,5% NS
 Revertentes/ μ g --
 Limite conf. --
 Resultado Negativo

a, b e c ver tabela 6.

Este mesmo composto, quando testado pelo procedimento de pré-incubação com ativação metabólica, para a cepa TA100, mostrou uma fraca correlação dose-efeito ($P=1,5\%$) (figura 26). Entretanto, não se observou uma resposta significativa pela análise de Anova ($P=22,8\%$) (tabela 10), e a atividade mutagênica foi sempre menor que o dobro da espontânea nas doses testadas.

Este resultado nos leva a admitir uma provável indução de mutagenicidade da 5-metoxicantin-6-ona. Porém, devido à quantidade insuficiente do alcalóide, não foi possível realizar experimentos adicionais com concentrações maiores.

Tabela 10 - Indução de revertentes HIS^+ em cepa de *S. typhimurium* TA100, em presença de mistura de ativação metabólica, pelo alcalóide 5-metoxicantin-6-ona (procedimento de pré-incubação).

DOSE (μg)	N.º REVERTENTES			MÉDIA \pm D.P.	IM
0	33	25	26	28,00 \pm 4,36	--
5	34	24	29	29,00 \pm 5,00	1,03
10	36	27		31,50 \pm 6,36	1,12
20	29	32	34	31,67 \pm 2,52	1,13
40	36	35	39	36,67 \pm 2,08	1,31
CP	118	118		118,00	4,21

Mutação espontânea: 29,00 \pm 2,64

Análise estatística:

P Análise variância	22,8%	NS
Mod. aceitável (p)	Linear	(96,5%)
P dose-resposta	1,5%	
Revertentes/ μg	--	
Límite conf.	--	
Resultado	Negativo	

Os valores do número de revertentes espontâneos encontrados nos experimentos realizados, estão de acordo com as variações mínima e máxima daqueles obtidos no histórico do Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia (UFRGS) (anexos 2 e 3).

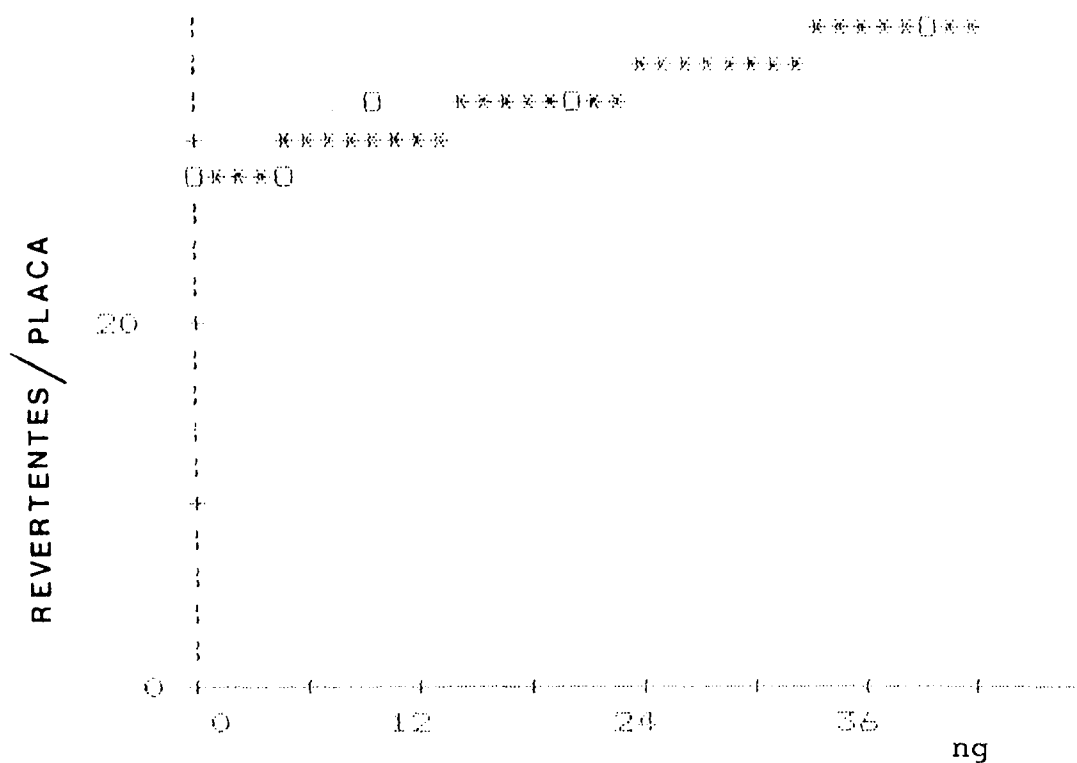


Figura 26 - Teste de Ames: curva dose-efeito para a cepa TA100 de *S. typhimurium* (com pré-incubação e "S9 mix").

3.2.3. Efeito citotóxico em cepas haplóides de *S. cerevisiae*, proficientes e deficientes nas vias de reparação

Neste experimento, procurou-se avaliar o efeito citotóxico provocado pela fotoadição da anisocumarina H, sobre culturas de cepa haplóide N123 de *S. cerevisiae*, proficiente nas vias de reparação, em presença da radiação UV 365 nm. As possíveis lesões fotoinduzidas ao DNA foram avaliadas utilizando-se as cepas mutantes deficientes no reparo por excisão-ressíntese (**rad3-2**) e recombinogênica (**rad52-1** - reparação de quebra de cadeias).

Para estabelecer-se as condições ideais de trabalho, foram realizados testes prévios com diferentes concentrações da droga e sob diferentes tempos de incubação. A concentração ideal encontrada foi 5×10^{-5} M, já que em doses superiores ocorre a precipitação da droga na suspensão celular. Trabalhos anteriormente realizados com furocumarinas também utilizam esta concentração (AVERBECK & MOUSTACCHI, 1975; CASSIER et al., 1984; HENRIQUES et al., 1985).

A tabela 11 mostra que o efeito letal sobre a cultura de cepa N123, em fase estacionária de crescimento após os tempos de 60 e 120 minutos de incubação com a anisocumarina H, é praticamente o mesmo que com 30 minutos de incubação. Em adição, trabalhos realizados têm demonstrado que o efeito letal provocado pela fotoadição de furocumarinas sobre culturas desta mesma cepa selvagem, é

máximo em 30 minutos de incubação (AVERBECK & MOUSTACCHI, 1975). Por este motivo, este tempo foi adotado nos outros experimentos.

Tabela 11 - Percentual de sobrevivência da cepa selvagem N123 de *S. cerevisiae*, em fase estacionária de crescimento, após diferentes tempos de incubação com a anisocumarina H (5×10^{-5} M), sob radiação UV 365 nm (8 KJ.m^{-2}).

TEMPO DE INCUBAÇÃO (min)	ANISOCUMARINA H
0	100
30	42,71
60	42,84
120	38,36

A figura 27 mostra que não há um efeito citotóxico importante da anisocumarina H + UV 365 nm sobre a cepa selvagem N123 nas fases de crescimento exponencial e estacionária.

O efeito citotóxico da anisocumarina H + UV 365 nm sobre as culturas de células mutantes *rad3-2* e *rad52-1*, em fase de crescimento exponencial, não ocorreu, observando-se uma alta viabilidade celular (médias de sobrevivência de 93,67 % e 92,45 % para as cepas deficientes nas vias de reparação por excisão-ressíntese e recombinação, respectivamente) (figura 27).

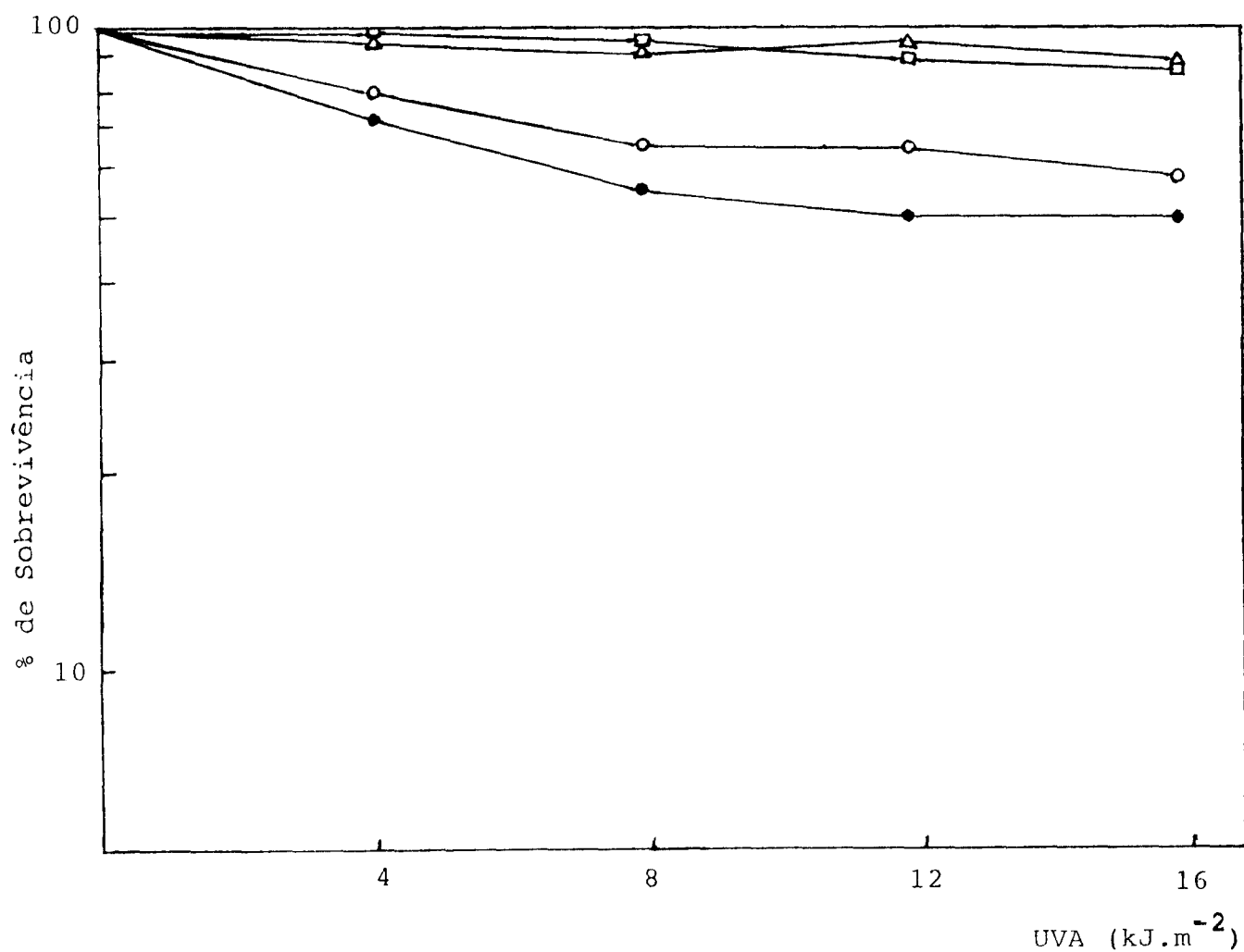


Figura 27 - Curvas de % de sobrevivência das linhagens selvagem N123 de *S. cerevisiae* em fase estacionária (●); em fase exponencial (○) e das mutantes, em fases exponenciais, *rad3-2* (Δ) e *rad52-1* (◻), após tratamento com a anisocumarina H e radiação UV 365 nm.

4. DISCUSSÃO

Através da análise sistemática de vegetais, muitas drogas e substâncias naturais com interesse farmacêutico e econômico têm sido incluídas nas Farmacopéias. Sabe-se que certas famílias de vegetais são particularmente ricas em substâncias tóxicas, outras em substâncias terapeuticamente ativas, e ainda outras com valores nutricionais.

Até há alguns anos atrás, a pesquisa de substâncias com atividade biológica foi baseada essencialmente em dados empíricos, isto é, de acordo com a tradição do uso pela medicina popular. Atualmente, a contribuição da investigação química sistemática, levando ao isolamento de metabólitos secundários, tem permitido a descoberta de novos compostos ativos.

Por outro lado, as atividades farmacológicas ou biológicas determinadas por certas espécies de plantas, podem dar ao químico sistemático ou ao químico de produtos na-

turais o direcionamento na exploração de certas classes de substâncias.

A importância da família Rutaceae estende-se às áreas farmacológica, terapêutica e econômica. Muitos metabólitos secundários, isolados de várias espécies, tiveram suas atividades avaliadas em sistemas "in vivo" e "in vitro", principalmente no que se refere às ações antitumoral, sobre o tecido cardíaco, sobre o sistema nervoso central, sobre a circulação (WAGNER, 1977) e sobre desordens cutâneas (AVERBECK, 1988 e 1989).

As dihidrochalconas preparadas a partir de glicosídeos flavanônicos, que ocorrem em várias espécies de **Citrus**, possuem um poder adoçante muitas vezes superior à sacarose, D-frutose, sacarina, aspartame e esteviosídeo, o que implica em um grande interesse econômico. Além destes produtos, os frutos "in natura", como limão, laranja, tangerina, pomelo e seus sucos, fazem parte das dietas alimentares, onde o alto teor de vitamina C tem importância nutricional-fisiológica. Os óleos voláteis, por exemplo o óleo de bergamota e o óleo das flores de laranjeira, são usados na indústria cosmética devido ao perfume especial. O óleo das flores de laranjeira é o componente básico da "Água de Colônia". Também, o ácido cítrico é extraído de limão, lima e bergamota (WAGNER, 1977).

A espécie **Zanthoxylum chiloperone** não tem utilização na medicina popular. Sua madeira, clara, dura e resistente, é utilizada na construção civil, obras internas,

cepos para tamancos e carpintaria. Ela é conhecida popularmente em São Paulo e Rio de Janeiro, onde é amplamente distribuída, como tembetaru (outras espécies, como *Z. narangillo* Griseb., *Metrodorea nigra* St. Hil. e *Z. cuiabense*, também são assim denominadas) ou tambaru-de espinho e na Venezuela como mapurito (PIO CORREA, 1984).

KUCK et al. (1966 e 1967) descrevem o isolamento dos alcalóides candicina, (+)-tembetarina, (+)-magnoflorina, (+)-laurifolina, celeritrina e nitidina do córtex de *Fagara chiloperone* Engl. (*Zanthoxylum chiloperone*), encontrada na Argentina. Após estes relatos, não foram mais encontrados dados na literatura em relação a esta espécie.

No presente trabalho, das raízes de *Z. chiloperone* foram obtidos os alcalóides cantin-6-ona, 5-metoxicantin-6-ona, celeritrina e esquimianina e as cumarinas trans-avicenol e trans-avicenina. As folhas forneceram o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona e a cumarina anisocumarina H.

O alcalóide cantin-6-ona, derivado do triptofano, foi isolado pela primeira vez em 1952 por HAYNES et al., da espécie *Pentaceras australis* (Rutaceae). A partir daí, este composto e outros 35 alcalóides com estruturas semelhantes foram identificados também em espécies de Simaroubaceae, Amaranthaceae, Caryophyllaceae e Malvaceae. Destas 35 estruturas relacionadas, 29 foram isoladas em Simaroubaceae, sendo portanto esta classe de alcalóides importante marcadora taxonômica nesta família (OHMOTO & KOIKE, 1989).

Na família Rutaceae, o alcalóide cantin-6-ona é mais raramente encontrado, ocorrendo em **P. australis**, em 7 espécies do gênero **Zanthoxylum** e em 3 espécies do gênero **Fagara**; o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona foi encontrado em **P. australis** e em 2 espécies de **Zanthoxylum** (OHMOTO & KOIKE, 1989).

O alcalóide quaternário celeritrina, do grupo benzofenantridínico originado da tirosina, é comumente encontrado na família Rutaceae, porém não exclusivo. Das 24 espécies de Rutaceae que contêm este alcalóide, 23 espécies pertencem ao complexo **Zanthoxylum/Fagara** (MESTER, 1973). Estes dados corroboram a presença de celeritrina em **Z. chiloperone**, em concordância com o resultado obtido por KUCK et al. (1966 e 1967).

O alcalóide esquimianina pertence ao grupo furoquinoleínico, encontrado exclusivamente na família Rutaceae, sendo por isto um importante marcador quimiotaxonômico. Até 1973, este alcalóide foi identificado em 85 espécies desta família, 17 do complexo **Zanthoxylum/Fagara** (MESTER, 1973).

As piranocumarinas trans-avicenol e trans-avicenina foram relatadas somente em Rutaceae, mais especificamente nas espécies **Zanthoxylum avicennae**, **Z. elephantiasis**, **Z. dipetalum** e **Eriostemon coccineus**, esta última apresentando somente avicenina (MURRAY et al., 1982).

A avicenina foi isolada pela primeira vez de **Z. avicennae** (ARTHUR et al., 1959) e dois trabalhos posteriores (ARTHUR & LEE, 1960; ARTHUR & OLLIS, 1963) fizeram

inferências sobre a sua correta conformação estrutural, não chegando porém a um consenso. Somente em 1975, com o isolamento do trans-avicenol desta mesma espécie, é que determinou-se a sua estrutura como sendo uma piranocumarina angular (GRAY et al., 1975). Neste trabalho, o trans-avicenol foi submetido a uma desidratação com fosgênio, produzindo com alto rendimento a avicenina. Estes autores propõem, a partir de seus resultados, que a avicenina seria um artefato em *Z. avicennae*, em função de que nos trabalhos anteriores, as diferenças nas técnicas de extração e purificação envolveram tratamentos com ácidos, bases e clorofórmio a quente, e também porque foram obtidas pequenas quantidades da mesma. Esta conclusão pode ser confirmada pelo fato de que o isolamento de trans-avicenol sempre é acompanhado da obtenção de trans-avicenina, exceto na espécie *Eriostemon coccineus*, na qual foi detectada somente a presença de avicenina (para revisão ver MURRAY et al., 1982), e na espécie *Z. dipetalum*, na qual foi isolado somente o trans-avicenol (FISH et al. 1975).

As piranocumarinas , tanto lineares como angulares, não são muito abundantes na natureza, ocorrendo quase que totalmente em Rutaceae (cerca de 72 espécies), e eventualmente em Umbelliferae (4 espécies), Moraceae (2 espécies) e Goodeniaceae (1 espécie) (MURRAY et al. 1982). Desta forma, elas poderiam servir como marcadoras quimiotaxonômicas para a família Rutaceae.

A cumarina anisocumarina H, obtida como produto majoritário das folhas de *Z. chiloperone*, foi isolada anteriormente em 1989 das folhas de *Clausena anisata* (Rutaceae) (NGADJUI et al., 1989).

Cumarinas preniladas são bastante comuns, porém aquelas com cadeia lateral de 10 carbonos (geranil) são menos abundantes e apresentam um menor número de diversidades estruturais. Uma das cumarinas mais conhecidas, em cuja posição 7 encontra-se uma cadeia geranil, é o aurapteno. Este ocorre basicamente nas famílias Rutaceae (17 espécies), Compositae (20 espécies) e Umbelliferae (12 espécies). Outras cumarinas com o substituinte geranil, tanto na posição 7 como em outras posições do núcleo cumarínico, são também encontradas nestas 3 famílias (MURRAY et al. 1982).

A avaliação da atividade biológica de substâncias isoladas de vegetais tem grande interesse, mesmo daqueles vegetais que não tem utilização na medicina popular ou na fitoterapia, como é o caso de *Z. chiloperone*. Deste vegetal foram isolados alguns alcalóides e cumarinas, sendo que alguns dos primeiros, como a cantin-6-ona, 5-metoxycantin-6-ona, celeritrina e esquimianina têm sido avaliados quanto às atividades farmacológicas, especialmente como antimicrobianos e antitumorais.

As propriedades antimicrobianas de cantin-6-ona e 5-metoxycantin-6-ona foram comparadas com a estreptomicina, em várias cepas de microorganismos. A cantin-6-ona

apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 25 µg/ml em cepas de *Staphylococcus aureus* (estreptomicina: CIM = 3,1 µg/ml), 50 µg/ml em *Pasteurella multocida* (estreptomicina: CIM = 6,2 µg/ml) e de 12,5 a 25 µg/ml em *Mycobacterium smegmatis* (estreptomicina: CIM = 1,56 - 0,2 µg/ml), além da atividade contra *C. albicans*. Nas demais cepas, incluindo *E. coli* e *S. typhimurium*, este alcalóide foi inativo; 5-metoxicantin-6-ona foi inativo em todas as cepas testadas (MITSCHER et al., 1972).

Estes dois alcalóides, quando testados sobre carcinoma de Eagles de nasofaringe (sistema KB), não apresentaram ação citotóxica (CORDELL et al., 1978). Porém, quando testados quanto a sua citotoxicidade em células epiteliais GPK, mostraram-se ativos, sendo que as concentrações inibitórias 50 % (CI₅₀) não diferiram significativamente entre si (cantin-6-ona: CI₅₀ = 1,11 µg/ml e 5-metoxicantin-6-ona: CI₅₀ = 5,44 µg/ml) (ANDERSON et al., 1983).

A fototoxicidade de cantin-6-ona em bactéria e fungo, sob radiação UV 365 nm, foi observada, porém ela foi menor que a produzida pela furocumarina 8-MOP. A atividade inibitória "in vitro" de 5-metoxicantin-5-ona sobre AMPc-fosfodiesterase foi grande quando comparada com o controle papaverina. A taxa de fluxo sanguíneo no estômago de coelhos ("in vivo") foi aumentada em 10 % com a cantin-6-ona, e no intestino foi aumentada 15 % (para revisão ver OHMOTO & KOIKE, 1989).

O alcalóide quaternário celeritrina é proposto para uso terapêutico em processos inflamatórios orais, baseados na sua alta atividade antiinflamatória determinada pelo teste do edema de pata de rato produzido por carragenina, na sua ação antimicrobiana em bactérias gram-positivas e *C. albicans* e na sua baixa toxicidade, tanto aguda ($DL_{50} = 95$ mg/kg) como crônica (exames histológicos de tecidos hepático, renal, suprarrenal, do miocárdio, do estômago, do duodeno, do baço e dos pulmões não apresentaram significantes variações morfológicas) (LENFELD et al., 1981).

A celeritrina mostrou atividade antileucêmica contra sistema L 1210 em camundongos e contra carcinoma de Erlich em camundongos. Os alcalóides benzofenantridínicos possuem sistema aromático policíclico e carga positiva no nitrogênio quaternário, o que possibilitaria a intercalação entre os pares de bases das hélices dos ácidos nucleicos ou a formação de complexos iônicos com o DNA, sendo este possivelmente um dos sítios de atividade antitumoral (para revisão ver KAKIUCHI et al., 1987).

Este mesmo alcalóide, quando testado no cromoteste SOS, não apresentou indução da função SOS em *E. coli*, mesmo na presença de mistura de ativação metabólica (VON POSER, 1987), sendo portanto não genotóxico.

O alcalóide furoquinoleínico esquimianina, em um complexo férrico com o cloridrato de 2-arilquinolina dubamina, mostrou forte atividade antimicrobiana (para revisão ver GRUNDON, 1988). VON POSER (1987) detectou uma

indução da função SOS em *E. coli* pela esquimianina, quando se utilizou sistema microsossomal ativado com aroclor 1254, demonstrando portanto atividades genotóxica e mutagênica.

Quanto às cumarinas, a possibilidade das furocumarinas e outras, como a 5,7-dimetoxicumarina (para revisão ver SONG & TAPLEY, 1979), se intercalarem e reagirem covalentemente com as bases pirimídicas do DNA, tem levado a muitos estudos que avaliam o tipo e o risco destas reações, visando o seu uso na terapêutica.

Desta forma, procurou-se estabelecer possíveis atividades genotóxicas e/ou mutagênicas de 5-metoxicantin-6-ona e o efeito letal em sistema eucariótico da anisocumarina H. Com a utilização de testes microbianos, pode-se determinar a atividade mutagênica de substâncias químicas, o que evidenciaria uma possível potencialidade oncogênica das mesmas (McCANN & AMES, 1977; AMES, 1979).

Atualmente, está bem estabelecido que agentes mutagênicos e carcinogênicos, de uma maneira geral, atuam diretamente sobre o DNA ou indiretamente através de seus produtos de metabolização (SINGER & KUSMIEREK, 1982; FRIEDBERG, 1985).

Neste trabalho, a 5-metoxicantin-6-ona, quando avaliada pelo cromoteste SOS, apresentou atividade genotóxica na ausência de mistura de ativação metabólica (tabela 5), sendo que na presença desta, verificou-se que os metabólitos do alcalóide foram também eficazes em induzir as funções SOS

(tabela 5) na mesma magnitude de potência (SOSIPs de $2,76 \times 10^{-2}$ e $2,78 \times 10^{-2}$, respectivamente).

As sensibilidades determinadas para este alcalóide no cromoteste SOS, sem e com metabolização, respectivamente 37,6 e 40,0 nmol, estão dentro da mesma ordem de grandeza daqueles determinados para produtos conhecidamente carcinogênicos, como o metilmetanossulfonato (20 nmol), o dietilsulfato (30 nmol), a β -propiolactona (<20 nmol), a dimetilnitrosamina (40 nmol), a dietil-nitrosamina (60 nmol), o 9,10-dimetilantraceno (30 nmol), a N-nitroso-dietilamina (30 nmol), a N-nitrosometilurea (40 nmol), a propilenoimina (80 nmol) (QUILLARDET et al., 1982b; QUILLARDET et al., 1985).

A comparação de resultados obtidos no cromoteste SOS e no teste de Ames (Salmonella/microsoma) para várias substâncias, indicam uma forte correlação (em ordem superior a 7 vezes) entre a indução do sistema SOS e mutagênese, confirmando, com poucas exceções, que genotoxinas mutagênicas são também indutoras SOS (QUILLARDET et al., 1982b; QUILLARDET et al., 1985).

No teste de Ames, quando o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona foi avaliado pelo método de incorporação, não verificou-se atividade mutagênica, porém quando pré-incubado com a cepa TA100 de *S. thyphimurium*, observou-se uma leve significância na curva dose-resposta ($P < 5\%$; tabela 10).

QUILLARDET et al. (1982b) relataram que os compostos reconhecidamente carcinogênicos, como a neocar-

cinostatina (NCS) e mitomicina C (MMC) apresentaram respostas positiva no cromoteste SOS sem metabolização e negativa no teste de Ames sem metabolização. O composto NCS é tóxico às bactérias, porém esta toxicidade é detectada em testes que não requerem a contagem de células sobreviventes, como é o caso do cromoteste SOS. Já o composto MMC é mutagênico somente em cepas *uvr+* de *Salmonella*, como por exemplo, a cepa TA102.

As condições experimentais entre os dois testes variam em alguns aspectos. O cromoteste SOS é realizado em meio líquido, enquanto que o teste de Ames sobre placas, onde o agar é o suporte que estabiliza a metabolização. Também, a concentração de mistura de ativação metabólica requerida para uma ótima ativação pode ser, para certos compostos, relativamente diferente em meio líquido ou em placas (QUILLARDET et al., 1985).

Para muitos compostos, a indução SOS em meio líquido pode revelar uma atividade genotóxica mais eficiente. A nitrosodimetilamina (NDMA) e nitrosodietilamina (NDEA) são, respectivamente, não ou fracamente detectadas como genotóxicas no teste de Ames por incorporação. Estes dois compostos apresentam uma significativa potência mutagênica se uma pré-incubação líquida é feita antes do plaqueamento. Ambos foram detectados como indutores no cromoteste SOS mas não no teste "spot SOS" (em placa). Desta forma, muitos alcalóides carcinogênicos requerem uma pré-incubação em

meio líquido para revelar sua atividade mutagênica no teste de Ames (MARON & AMES, 1983; QUILLARDET et al., 1985).

A sensibilidade, que reflete a capacidade de identificar compostos carcinogênicos, a especificidade, que discrimina agentes carcinogênicos dos não-carcinogênicos, e a precisão, que identifica corretamente carcinogênicos e não-carcinogênicos, do cromoteste SOS e do teste de Ames os validam como testes rápidos que exploram a habilidade de muitas substâncias causarem danos ao DNA ou anormalidades cromossômicas direta ou indireta (QUILLARDET et al., 1985; HENRIQUES et al., 1987).

Os testes em sistemas eucarióticos também têm sido muito utilizados para avaliar os danos causados por agentes físicos e/ou químicos ao DNA. A levedura **Saccharomyces cerevisiae**, por vários motivos já expostos, é um dos microorganismos de escolha para a determinação de compostos mutagênicos e recombinogênicos (para revisão ver ZIMMERMANN et al., 1984; MELO et al., 1986; PAULA-RAMOS et al., 1991).

As reações fotossensibilizantes provocadas pelas furocumarinas, que induzem efeitos citotóxicos ou genotóxicos em células de **S. cerevisiae**, são amplamente descritas na literatura (AVERBECK & MOUSTACCHI, 1975; SONG & TAPLEY, 1979; BEN-HUR & SONG, 1984; AVERBECK, 1989). Estas substâncias se intercalam entre os pares de bases do DNA, produzindo dois tipos de lesões: as monoadições e as biadições.

A anisocumarina H tem a dupla ligação C3-C4 disponível, e neste trabalho pretendeu-se, portanto, determinar a possível fotorreação com DNA, sob radiação UV 365 nm, formando monoadições, semelhante às furocumarinas monofuncionais, já descritas.

Observou-se que a cumarina não induziu uma letalidade destacada tanto na cepa selvagem como nas mutantes. Pode-se sugerir que há uma baixa fotoadição da mesma ao DNA sob luz UVA, explicando a alta viabilidade celular na cepa selvagem, na qual os mecanismos de reparação estariam funcionando eficientemente. Nas cepas deficientes nas vias de reparação por excisão-ressíntese (**rad3-2**) ou recombino gênica (**rad52-1**), a viabilidade observada sugere que tanto o mecanismo de excisão como o de reparação de quebras de cadeias (recombinogênico) podem corrigir, independentemente, as poucas lesões fotoinduzidas pela anisocumarina H no DNA.

É importante salientar que as monoadições fotoinduzidas pelas furocumarinas são reparadas por vias independentes (AVERBECK 1989), enquanto que as pontes entre cadeias de DNA dependem dos sistemas de excisão-ressíntese (tipo RAD3) e de recombinação (tipo RAD52) (HENRIQUES et al., 1985).

Estas colocações permitiram sugerir que as poucas reações fotoinduzidas pela anisocumarina H ao DNA sejam monoadições. Considerando que é provável que sob radiação UV 365 nm as lesões induzidas são poucas, ocasionando baixa letalidade celular, experimentos sob outros comprimentos de onda devem ser realizados.

5. CONCLUSÕES

1. O extrato éter de petróleo das raízes de **Zanthoxylum chiloperone** forneceu os alcalóides cantin-6-ona, em quantidade majoritária, e 5-metoxicantin-6-ona e as piranocumarinas angulares trans-avicenol e trans-avicenina.
2. O extrato diclorometânico das raízes de **Zanthoxylum chiloperone** forneceu os alcalóides celeritrina e esquimianina.
3. A partir do extrato éter de petróleo das folhas de **Zanthoxylum chiloperone** foi obtida a anisocumarina H.
4. O alcalóide 5-metoxicantin-6-ona, também presente nas raízes de **Zanthoxylum chiloperone**, foi isolado do extrato de alcalóides totais das folhas.
5. Os alcalóides cantin-6-ona e 5-metoxicantin-6-ona foram isolados anteriormente em 12 espécies de Rutaceae, sendo 11 do complexo **Zanthoxylum/Fagara**.
6. O alcalóide benzofenantridínico celeritrina não é restrito a Rutaceae, e das 24 espécies desta família onde foi relatado, 23 são do complexo **Zanthoxylum/Fagara**.

7. O alcalóide esquimianina pertence ao grupo furoquinoleínico, importante marcador quimiotaxonômico em Rutaceae.

8. As piranocumarinas angulares trans-avicenol e trans-avicenina foram descritas somente em 4 espécies de Rutaceae. A ocorrência deste grupo estrutural quase que exclusivamente em Rutaceae, poderia servir como marcadora quimiotaxonômica.

9. O Cromoteste SOS indicou que o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona, nas concentrações $1,5 \times 10^4$, 2×10^4 , 3×10^4 e 4×10^4 ng/teste, é um agente genotóxico direto, cujas potências indutoras SOS (SOSIP) na presença ou ausência de ativação metabólica foram $2,76 \times 10^{-2}$ e $2,78 \times 10^{-2}$, respectivamente.

10. Este mesmo alcalóide, quando testado quanto a sua atividade mutagênica pelo teste de Ames pelo método direto nas cepas TA98 e TA100, em presença ou ausência de ativação metabólica, não se mostrou mutagênico. Entretanto, quando adotou-se o procedimento de pré-incubação com ativação metabólica, a cepa TA100 apresentou uma resposta mutagênica positiva, cuja correlação dose-resposta é significativa ($P < 5\%$). Isto indica que o teste de Ames é mais sensível nesta condição de tratamento.

11. Os resultados descritos acima revelam que o alcalóide 5-metoxicantin-6-ona é genotóxico e mutagênico em organismos procarióticos.

12. A anisocumarina H não apresentou um efeito citotóxico pronunciado, quando testada em presença de radiação UV 365 nm, sobre células em fases estacionária e exponencial de crescimento de culturas da levedura haplóide selvagem N123 *Saccharomyces cerevisiae*.

13. O mesmo tipo de resposta foi observado após a fotoadição da anisocumarina H em células em fase exponencial de crescimento de cepas mutantes de levedura deficientes nas vias de reparação por excisão-ressíntese (*rad3-2*) e recombinogênica (*rad52-1*).

14. Estas observações indicam que a anisocumarina H mais UV 365 nm é capaz de induzir em células eucarióticas, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma fotolesão (provavelmente monoadição), a qual é eficientemente reparada.

6. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

1. ALSHAMA, A.; AL-DOURI, N.A.; PHILLIPSON, J.D. Alkaloids of *Haplophylum tuberculatum* from Iraq. *Phytochemistry*, v. 18, p. 1417-1419, 1979.
2. AMES, B.N. The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. In: *Chemical Mutagens, Principles Methods for their Detection*. New York: A. Hollaender, 1971. v. 1, p. 267-282.
3. AMES, B.N. Identifying Environmental Chemical causing Mutations and Cancer. *Sciences*, v.204, p. 587-593, 1979.
4. AMES, B.N.; DURSTON, W.E.; YAMASAKI, E.; LEE, F.D. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System combining Liver Homogenates for Activation, Bacteria for Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973b.
5. AMES, B.N.; LEE, F.D.; DURSTON, W.E. An improved Bacterial Test System for Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, v. 70, n. 3, p. 782-786, 1973a.
6. AMES, B.N.; McCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*, v. 31, p. 347-364, 1975.
7. ANDERSON, L.A.; HARRIS, A.; PHILLIPSON, J.D. Production of Cytotoxic Canthin-6-one Alkaloids by *Ailanthus altissima* Plant Cell Cultures. *J. Nat. Prod.*, v. 46, n. 3, p. 374-378, 1983.
8. ARTHUR, H.R.; HUI, W.H.; NG, Y.L. An Examination of the Rutaceae of Hong Kong. Part III. The Alkaloid, Avicine, from *Zanthoxylum avicennae*. *J. Chem. Soc.*, set./out., p. 4007-4009, 1959.
9. ARTHUR, H.R.; LEE, C.M. An Examination of the Rutaceae of Hong Kong. Part V. A New Coumarin, Avicennin, from the Bark of *Zanthoxylum avicennae*. *J. Chem. Soc.*, nov., p.4654 4657, 1960.
10. ARTHUR, H.R.; OLLIS, W.D. A Revised Structure for Avicennin *J. Chem. Soc.*, jul., p. 3910-3912, 1963.
11. AVERBECK, D. Photobiology of Furocoumarins. In: HELENE, C.; CHARLIER, M.; MONTENAY-GANESTIER, Th; LAUSTRIAT, G. (Ed.) *Trends in Photobiology*. New York: Plenum Press, 1982. p. 295-308.

12. AVERBECK, D. Relationship between Lesions Photoinduced by Mono- and Bifunctional Furocoumarin in DNA & Genotoxic Effects in Diploid Yeast. **Mutation Research**, v. 151, p. 217-233, 1985.
13. AVERBECK, D. Mutagenesis by Psoralens on Eukariotic Cells. In: MORENO, G.; POTTIER, R.M.; TRUSCOTT, T.C. (Ed.). **Photosensitisation, Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1988. v. H15, p. 279-291.
14. AVERBECK, D. Recent Advances in Psoralen Phototoxicity Mechanism. **Photochem. Photobiol.**, v. 50, n. 6, p. 859-882, 1989.
15. AVERBECK, D.; MOUSTACCHI, E. 8-Methoxypsoralen plus 365 nm Ligth Effects and Repair in Yeast. **Biochem. Biophys. Acta** v. 395, p. 393-404, 1975.
16. AVERBECK, D.; MOUSTACCHI, E. Decreased Photoinduced Mutagenicity of Mono-functional as opposed to Bifunctional Furocoumarins in Yeast. **Photochem. Photobiol.**, v. 31, p. 475-478, 1980.
17. AVERBECK, D.; MOUSTACCHI, E.; BISAGNI, E. Biological Effects and Repair of Damage Photoinduced by a Derivate of Psoralen Substitued at the 3,4 Reaction Side. I. Photoreactivity of this Compound and Lethal Effect in Yeast. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 518, p. 464-481, 1978.
18. BENFATO, M.S. Interações entre o gene PS03 e os genes PSO e RAD após fotoadição de furocumarinas e ao tratamento com as radiações UV de 254 nm. Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Genética da UFRGS, 1989. Dissertação (Mestrado em Genética).
19. BEN-HUR, E.; SONG, P.-S. The Photochemistry and Photobiology of Furocoumarins (Psoralens). **Advances in Radiation Biology**. New York: Academic Press, 1984. v. 11, p. 132- 171.
20. BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; McCANN, J.; PIKE, M.C. An Empirical Approach to the Statistical Analysis of Mutagenesis Data from the **Salmonella** Test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.
21. BHATTACHARYYA, J.; SERUR, L.M.; CHERIYAN, V.O. Isolation of the Alkaloid of **Monnieria trifolia**. **J. Nat. Prod.**, v. 47,n. 2, p. 379-381, 1984.
22. BOVEY, F.A. **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. New York: Academic Press, 1969.

23. BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. **Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry.** San Francisco: Holden-Day, 1964.
24. CHANET, R.; CASSIER, C.; MAGANA-SCHWENCKE, N.; MOUSTACCHI, E. Fate of Photoinduced 8-Methoxypsoralen Monoadducts in Yeast. Evidence for Bypass of these Lesions in the Absence of Excision-repair. **Mutation Research**, v. 112, p. 201-214 1983.
25. CASSIER, C.; CHANET, R.; MOUSTACCHI, E. Mutagenic and Re combinogenic Effects of DNA Cross-links induced in Yeast by 8-Methoxypsoralen Photoaddition. **Photochem. Photobiol.** v. 39, p. 799-803, 1984.
26. CHANG, C.-J.; FLOSS, H.G.; STECK, W. Carbon-13 Magnetic Resonance Spectroscopy of Coumarins. Carbon-13-Proton Long-range Couplings. **J. Org. Chem.**, v. 42, n. 8, p. 1337-1340 1977.
27. CLUGSTON, D.M.; MacLEAN, D.B. Mass Spectra of some Furoquinoline Alkaloids. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 43, p. 2516, 1965.
28. CORDELL, G.A.; OGURA, M.; FARNSWORTH, N.R. Alkaloid Constituents of *Ailanthus excelsa* (Simaroubaceae). **Lloydia**, v. 41, n. 2, p. 166-168, 1978.
29. CUSSANS, N.J.; HUCKERBY, T.N. Carbon-13 NMR Spectroscopy of Heterocyclic Compounds - IV. A 20MHz Study of Chemical Shifts and Carbon-Proton Coupling Constants in a Series of Hydroxi, Methoxy and Glucosyl Coumarins. **Tetrahedron**, v. 31, p. 2719-2726, 1975.
30. DALL'ACQUA, F. New Chemical Aspects of the Photoreaction between Psoralen and DNA. In: CASTELLANI, A. (Ed.). **Research Photobiology.** New York: Plenum Press, 1977. p. 245-255.
31. DAS, K.G.; FUNKE, P.T.; BOSE, A.K. Mass Spectral Studies. III. Fragmentation of Aromatic Amides. **J. Am. Chem. Soc.** v. 86, p. 3729-3732, 1964.
32. DEVORET, R. Long-term and Short-term Screening Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. **International Agency for Research on Cancer.** Lyon, 1980. sup. 2, p. 85-105.
33. ENGLER, A. Rutaceae. In: Martius, K. (ed.). **Fl. Bras.**, v. 12, n. 2, p. 170-171, 1874.

34. FAHRIG, R. Genetic Mode of Action of Cocarcinogens and Tumor Promoters in Yeast and Mice. **Molecular and General Genetics**, v. 194, p. 7-14, 1984.
35. FISH, F.; GRAY, A.I.; WATERMAN, P.G. Alkaloids, Coumarins, Triterpenes and a Flavanone from the Root of *Zanthoxylum dipetalum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2073-2076, 1975.
36. FISH, F.; WATERMAN, P.G. Chloroform-soluble Alkaloids of the Root Bark of *Fagara viridis*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 3325-3327, 1971.
37. FISH, F. ; WATERMAN, P.G. Chemosystematics in the Rutaceae II. The Chemosystematics of the *Zanthoxylum/Fagara* Complex **Taxon**, v. 22, n. 2/3, p. 177-203, 1973.
38. FORGACS, P. ; PROVOST, J.; TOUCHÉ, A. Alcaloides Indoliques d'*Odyendea gabonensis*. **Planta Medica**, v. 46, p. 187-189, 1982
39. FRIEDBERG, E.C. **DNA Repair**. New York: W.H. Freeman, 1985.
40. FRIEDBERG, E.C. Desoxyribonucleic Acid Repair in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Review**, v. 52, p. 70-102, 1988.
41. GAME, J.C. Radiation-sensitive Mutants and DNA Repair in Yeast. In: SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M.; SMITH, A.R.M. (Ed.). **Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects**. New York: Springer-Verlag, 1983. p. 109-137.
42. GRAY, A.I.; WAIGH, R.D.; WATERMAN, P.G. Avicennol: A New Pyranocoumarin from the Root-bark of *Zanthoxylum avicennae* and its Conversion into Avicennin. **J. Chem. Soc. Perkin Trans I**, v. 5, p. 488-491, 1975.
43. GRUNDON, M.F. Quinoline Alkaloids Related to Anthranilic Acid. In: BROSSI, A. (Ed.). **The Alkaloids - Chemistry and Pharmacology**. San Diego: Academic Press, 1988. v. 32, cap. 5, p. 341-439.
44. HENRIQUES, J.A.P.; BRENDDEL, M. The Role **PSO** and **SNM** Genes in DNA Repair of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 18, p. 387-393, 1990.

45. HENRIQUES, J.A.P.; DA SILVA, K.V.C.L.; MOUSTACCHI, E. Interaction between Genes Controlling Sensitivity to Psoralen (**ps**) and to Radiation (**rad**) after 3-Carbethoxypsoralen plus 365 nm UV Ligth Treatment in Yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 201, p. 415-420, 1985.
46. HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Sensitivity to Photoaddition of Mono and Bifunctional Furocoumarins of X-Ray Sensitive Mutants of **Saccharomyces cerevisiae**. **Photochem. Photobiol.**, v. 31, p. 557-563, 1980a.
47. HENRIQUES, J.A.P.; MOUSTACCHI, E. Isolation and Characterization of **ps** Mutants Sensitive to Photo addition of Psoralen Derivatives in **Saccharomyces cerevisiae**. **Genetics** v. 95, p. 273-288, 1980b.
48. HENRIQUES, J.A.P.; VALSA, J.O.; GOMES, R.A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: DA COSTA, S.O.P. **Genética Molecular e de Microorganismos**. São Paulo: Manole, 1987. cap. 21, p. 330-350.
49. JACKMAN, L.M.; STERNHELL, S. **Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry**. 2ed. Braunschweig: Pergamon Press, 1969.
50. JOULE, J.A.; DJERASSI, C. Alkaloid Studies. Part XLV. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. Part XLII. Some Aspects of the Chemistry and Mass Spectrometry of Uleine. **J. Chem. Soc.**, p. 2777-2790, 1964.
51. KAKIUCHI, N.; HATTORI, M.; ISHI, H.; NAMBA, T. Effect of Benzo(C)phenanthridine Alkaloids on Reverse Transcriptase and their Binding Property to Nucleic Acids. **Planta Medica**, v. 53, p. 22-27, 1987.
52. KINSELLA, A.; RADMAN, M. Tumor Promoters Induces Sister Chromatid Exchanges: Relevance to Mechanisms of Carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.**, v. 71, p. 4159-4163, 1978.
53. KUCK, A.M.; ALBONICO, S.M.; DEULOFEU, V. Alkaloids from Argentine **Fagara** Species. **Chem. Ind.**, v. 4, p. 945-946, 1966.
54. KUCK, A.M.; ALBONICO, S.M.; DEULOFEU, V.; ESCALANTE, M.G. Alkaloids from Argentine **Fagara** Species. **Phytochemistry** v. 6, p. 1541-1550, 1967.

55. KUNZ, B.A.; HANNAN, M.A.; HAYNES, R.H. Effect of Tumor Promoters on Ultraviolet Light-induced Mutation and Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cancer Research** v. 40, p. 2323-2329, 1980.
56. KUNZ, B.A.; HAYNES, R.H. Phenomenology and Genetic Control of Mitotic Recombination in Yeast. **Annual Review of Genetics**, v. 15, p. 57-89, 1981.
57. LENFELD, J.; KROUTIL, M.; MARSALEK, E.; SLAVIK, J.; PREININGER, V.; SIMANEK, V. Antiinflammatory Activity of Quaternary Benzophenanthridine Alkaloids from *Chelidonium majus*. **Planta Medica**, v. 43, p. 161-165, 1981.
58. LEVIN, D.E.; HOLLSTEIN, M.; CHRISTMAN, M.F.; SCHWIERS, E.A.; AMES, B.N. A New Salmonella Tester Strain (TA102) with A.T. Base Pairs at the Site of Mutation Detects Oxidative Mutagens. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 79, p. 7445-7449, 1982.
59. LITTLE, J.W. The SOS Regulatory System: Control of its State by the Level of RecA Protease. **Journal of Molecular Biology**, v. 167, p. 791-808, 1983.
60. LITTLE, J.W.; MOUNT, D.W. The SOS Regulatory System of *Escherichia coli*. **Cell**, v. 29, p. 11-22, 1982.
61. MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.
62. McCANN, J.; AMES, B.N. The Salmonella/Microsome Mutagenicity Test: Predictive Value for Animal Carcinogenicity. In: WINSTEN, J.A. **Origins of Human Cancer**. New York: Cold Spring Harbor, 1977.
63. MELO, A.A.; QUEROL, C.B.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.P. Cytostatic, Citotoxic and Mutagenic Effects of the Voacristine and Indole Alkaloid in Wild Type and Repair Deficient Yeasts. **Mutation Research**, v. 171, p. 17-24, 1986.
64. MEMORY, J.D.; WILSON, N.K. **NMR of Aromatic Compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1982.
65. MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; MOCHAYEDI, S. Sources of Variability of the *Escherichia coli* PQ37 Genotoxicity Assay (SOS Chromotest). **Mutation Research**, v. 252, p. 51-60, 1991.

66. MESTER, I. The Occurrence of the Alkaloids in Rutaceae. **Fitoterapia**, v. 44, p. 123-152, 1973
67. MILLER, J.H. **Experiments in Molecular Genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.
68. MILLER, R.D.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Different Effects of **RAD** Genes of **Saccharomyces cerevisiae** on Incisions of Interstrand Cross-links and Mono-adducts in DNA induced by Psoralen plus near UV Light Treatment. **Photochem. Photobiol.**, v. 39, p. 349-352, 1984.
69. MITSCHER, L.A.; SHOWALTER, H.D.H.; SHIPCHANDLER, M.T.; LEU, R.P.; BEAL, J.L. Antimicrobial Agents from Higher Plants. IV. **Zanthoxylum elephantiasis**. Isolation and Identification of Canthin-6-one. **Lloydia**, v. 35, n. 2, p. 177-180, 1972.
70. MORENO, P.R.H. **Alcalóides de Nectandra grandiflora Nees et Mart. ex. Nees. Análise química e biológica**. Porto Alegre Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1989. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
71. MOUSTACCHI, E. DNA Repair in Yeast: Genetic Control and Biological Consequences. In: LETT, J. (Ed.). **Advances in Radiation Research**. New York: Academic Press, 1987. v. 13, p. 1-30.
72. MOUSTACCHI, E.; CASSIER, C.; CHANET, R.; MAGANA-SCHWENCKE, N.; SAEKI, N.; HENRIQUES, J.A.P. Biological Role of Photoinduced Crosslinks and Monoadducts in Yeast DNA: Genetic Control and Steps involved in their Repair. In: FRIEDBERG, E.C.; BRIDGES, A. (Ed.). **Cellular Responses to DNA Damage** New York: Alan Liss, 1983b. p. 87-106.
73. MOUSTACCHI, E.; FAVAUDON, V. Citotoxic and Mutagenic Effects of Neocarzinostatin in Wild-type and Repair-deficient Yeast. **Mutation Research**, v. 104, p. 87, 1982.
74. MOUSTACCHI, E.; FAVAUDON, V.; BISAGNI, E. Likelihood of the New Antitumoral Drug 10-[4-diethylaminopropylamino]-6-methyl-5H-pyrido [3',4':4,5] pyrrolo [2,3-g] isoquinoline (BD-40), a Pyridopyrroloisoquinoline Derivative, to induce DNA Strand Breaks "in vivo" and its non Mutagenicity in Yeast. **Cancer Research**, v. 43, p. 3700-3706, 1983a.
75. MURRAY, R.D.H.; FORBES, I.T. Synthesis of the Coumarins, Avicennol, Dipetaline and Dipetalolactone. **Tetrahedron**, v. 34, p. 1411-1414, 1978.

76. MURRAY, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The Natural Coumarins - Occurrence, Chemistry and Biochemistry.** Bristol: John Wiley & Sons, 1982.
77. NGADJUI, B.T.; AYAFOR, J.F.; SONDEGAM, B.L.; CONNOLLY, J.D. Prenylated Coumarins from the Leaves of **Clausena anisata**. **J. Nat. Prod.**, v. 52, n. 2, p. 243-247, 1989.
78. ODEBIYI, O.O.; SOFOWORA, E.A. Antimicrobial Alkaloids from a Nigerian Chewing Stick. **Planta Medica**, v. 36, p. 204-207, 1979.
79. OHMOTO, T.; KOIKE, K. Canthin-6-one Alkaloids. In: BROSSI, A. (Ed.). **The Alkaloids**. San Diego: Academic Press, 1989 v.36, cap. 3, p. 135-170.
80. PARSONS, B.J. Psoralen Photochemistry. **Photochem. Photobiol.**, v. 32, p. 813-821, 1980.
81. PAULA-RAMOS, A.L.L. **Efeito genotóxico, mutagênico e recombinogênico de alcalóides pirrolizidínicos do gênero Senécio, em células procarióticas e eucarióticas.** Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Genética da UFRGS, 1986. Tese (Doutorado em Genética).
82. PAULA-RAMOS, A.L.L.; QUEROL, C.B.; MARQUES, E.K.; HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic Activation of the Pyrrolizidine Alkaloid Integerrimine in the Yeast **Saccharomyces cerevisiae** is caused by Repairable DNA Damage. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 14, n. 4, p. 897-912, 1991.
83. PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. v. VII, p. 217-218.
84. QUILLARDET, P.; DE BELLECOMBE, C.; HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Validation Study with 83 Compounds. **Mutation Research**, v. 147, p. 79-95, 1985.
85. QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Procedures. **Mutation Research**, v. 147, p. 65-78, 1985.
86. QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The Screening, Diagnosis and Evaluation of Genotoxic Agents with Batteries of Bacterial Tests. **Mutation Research**, v. 205, p. 107-118, 1988.

87. QUILLARDET, P.; HUISMANN, O.; D'ARI, R.; HOFNUNG, M.
SOS Chromotest, a Direct Assay of Induction of an
SOS Function in *E. coli* K-12 to Measure
Genotoxicity. **Proceedings of the National Academy
of Sciences, U.S.A.**, v. 79, p. 5971- 5975, 1982a.
88. QUILLARDET, P.; HUISMANN, O.; D'ARI, R.; HOFNUNG, M.
The SOS Chromotest: Direct Assay of the
Expression of Gene *sfiA* as a Measure of Genotoxicity
of Chemicals. **Biochimie** v. 64, p. 797-801, 1982b.
89. ROSSMAN, T.G.; MOLINA, M.; MEYER, L.W. The Genetic
Toxicology of Metal Compounds: I. Induction of
Prophage in *E. coli* WP2s (). **Environmental
Mutagenesis**, v. 6, p.59- 69, 1984.
90. ROSSMAN, T.G.; MOLINA, M.; MEYER, L.W.; BOONE, P.;
KLEIN, C. B.; WANG, Z.; LI, F.; LIN, W.C.; KINNEY,
P.L. Performance of 133 Compounds in the Lambda
Prophage Induction Endpoint of the Microscreen Assay
and a Comparision with *S. typhimurium* Mutagenicity
and Rodent Carcinogenicity Assays. **Mutation
Research**, v. 260, p. 349-367, 1991.
91. SANGSTER, A.W.; STUART, K.L. Ultraviolet Spectra of
Alkaloids. **Chemical Review**, p. 69-130, 1965.
92. SILVA, M.F.G.F. da; GOTTLIEB, O.R.; EHRENDOFFER, F.
Chemosystematics of the Rutaceae: Suggestions for a
more Natural Taxonomy and Evolutionary Interpretation
of the Family **Plant System. Evol.**, v. 161, p. 97-
134, 1988.
93. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C.
**Identificação Espectrométrica de Compostos
Orgânicos**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois,
1979.
94. SINGER, B.; KUSMIEREK, J.T. Chemical Mutagenesis.
Annual Review of Biochemistry, v. 52, p. 655, 1982.
95. SOFOWORA, E.A. **Medicinal Plants and Traditional
Medicine in Africa**. Chichester: John Wiley, 1982.
96. SONG, P.S.; TAPLEY, K.J. Photochemistry and
Photobiology of Psoralens. **Photochem. Photobiol.**,
v. 29, p. 1177-1197, 1979.
97. STECK, W.; MAZUREK, M. Identification of Natural
Coumarins by NMR Spectroscopy. **Lloydia**, v. 35,
n. 4, p. 418-439, 1972.
98. STHAL, E. (Ed.). **Thin Layer Chromatography**. 2 ed. New
York: Springer, 1969.

99. SUWANBORIRUX, K.; CHANG, C.-J.; CASSADY, J.M. Novel Chromones from *Spathelia sorbifolia*. *J. Nat. Prod.*, v. 50, n. 1 p. 102-107, 1987.
100. SWINEHART, J.A.; STERMITZ, F.R. Bishordeninyl Terpene Alkaloids and other Constituents of *Zanthoxylum culantrillo* and *Z. coriaceum*. *Phytochemistry*, v. 19, p. 1219-1223, 1980.
101. SYMINGTON, L.S.; FORGATY, L.M.; KOLODNER, R. Genetic Recombination of Homologous Plasmids Catalyzed by Cell-free Extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, v. 35, p. 805- 813, 1983.
102. VALENT, G.V. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo através do teste de Ames.** Campinas: Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1990. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de Genética).
103. VARGAS, V.M.F. **Avaliação de testes para triagem e diagnóstico de agentes genotóxicos ambientais.** Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Genética da UFRGS, 1992. Tese (Doutorado em genética).
104. VON POSER, G.L. **Rauwolfia sellowii Mul. Arg.: Análise química em espécies autêntica e comercializada. Determinação dos efeitos genotóxico, mutagênico e racombinogênico dos alcalóides em sistemas eucariótico e procariótico.** Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Farmácia da UFRGS, 1987. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
105. VON POSER, G.L.; ANDRADE, H.H.R.; DA SILVA, K.V.C.L.; HENRIQUES, A.T.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic, Mutagenic and Recombinogenic Effects of *Rauwolfia* Alkaloids. *Mutation Research*, v. 232, p.37-43, 1990.
106. WAGNER, H. Pharmaceutical and Economic Use of the Labiatae and Rutaceae Families. *Rev. Latinoamer. Quim.*, n. 8, p. 16-25, 1977.
107. WALKER, G.C. Mutagenesis and Inducible Responses to Deoxyribonucleic Acid Damage in *Escherichia coli*. *Microbiological Review*, v. 48, n. 1, p. 60-93, 1984.
108. WATERMAN, P.G. New Combinations in *Zanthoxylum* L. (1753). *Taxon*, v. 24, n. 2/3, p. 361-366, 1975.

109. WEHRLY, F.W.; NISHIDA, T. The Use of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Natural Products Chemistry. In: HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G.W. (Ed.) **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. New York: Springer-Verlag, 1979. v. 36, p. 55.
110. ZIMMERMANN, F.K.; BORSTEL, R.C. von; HALLE, E.S. von; PARRY, J.M.; SIEBERT, D.; ZETTERBERG, G.; BARALE, R.; LOPRIENO, N. Testing of Chemicals for Genetic Activity with *S. cerevisiae*: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 133, p. 199-244, 1984.

MolTox™

Molecular Toxicology, Inc.

111 Gibraltar St., Annapolis, MD 21401

**POST-MITOCHONDRIAL SUPERNATANT
QUALITY CONTROL STATEMENT**

LOT NO.: 0337 PRODUCT: LS-9 CATALOG NO: 0101L SPECIES: Rat
 STRAIN: Sprague Dawley TISSUE: Liver SEX: M BUFFER: 0.15M KCl
 INDUCING AGENT: Aroclor 1254 PREPARATION DATE: 9 June 1991

BIOCHEMISTRY:

- PROTEIN ASSAY

36.9 mg protein/ml (J.B.C., 193:265, 1951)

- 7-ETHOXYRESORUFIN-O-DEETHYLASE ACTIVITY ASSAY

14510 picomoles 7-hydroxyresorufin formed/min/mg protein
(Mutat. Res., 142:127, 1985)

- ANILINE HYDROXYLASE ACTIVITY ASSAY

469 picomoles p-aminophenol formed/min/mg protein
(J. Biochem. Japan., 60:417, 1966)

- p-NITROANISOLE-O-DEMETHYLASE ACTIVITY ASSAY

2678 picomoles p-nitrophenol formed/min/mg protein
(J. Pharmacol. Exp. Ther., 146:61, 1964)**BIOASSAY:**

- STERILITY TEST

-0- colonies contaminating microflora observed per ml product
after 72h incubation of 2.0, 1.0, 0.5 and 0.1ml product
on Trypticase Soy Agar at 37°C.

- SALMONELLA MUTAGENICITY ASSAY

No. TA100 Revertants/plate
ul S-9/plate

Pro- Mutagen	Dose (ug/plate)	0	10	20	50	100
2-AA	2.5	94	2465	2450	2355	1333
B(a)P	5.0	99	469	662	1201	1326

Plate incorporation test (Mutat. Res., 113:173, 1983)
 2-AA = 2-aminoanthracene; B(a)P = benzo(a)pyrene.

Storage and Handling Recommendations:S-9: Store @ ultralow temperatures. Thaw and maintain on ice during use.LS-9: Store below 8°C. Reconstitute with sterile distilled or deionized water using aseptic technique. Allow the pellet to rehydrate fully while on ice. Gentle agitation may be useful.

Telephone: (301) 268-7232

Telex: 209075 Moltox UR

Fax: (202) 861-0621



CENTRO DE
BIOTECNOLOGIA
DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO S
GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO S

Histórico dos valores de mutação espontânea para as linhagens de *Salmonella typhimurium* no Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia - UFRGS.

Linhagens	S9	Médias de Revertentes Espontâneos	Variação	
			Mínima	Máxima
TA97	-	108,77 ± 43,33	48	246
TA97	+	116,20 ± 79,17	58	311
TA98	-	28,23 ± 15,02	8	62
TA98	+	26,67 ± 13,31	12	87
TA100	-	125,71 ± 53,57	51	228
TA100	+	102,05 ± 47,28	39	206
TA102	-	152,18 ± 63,97	69	283
TA102	+	212,79 ± 79,96	42	439

Estes dados correspondem a 150 experimentos realizados consecutivamente no período de 25/09/91 a 15/05/92.

Faixa de mutação espontânea citada na literatura (Maron e Ames, 1983):

- TA97 : 90 a 180 revertentes por placa.
- TA97 : 30 a 50 revertentes por placa.
- TA100: 120 a 200 revertentes por placa.
- TA102: 240 a 320 revertentes por placa.



CENTRO DE
BIOTECNOLOGIA
DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO

Histórico dos valores de mutação espontânea do controle negativo (solvente) para *Salmonella typhimurium* no Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia - UFRGS.

Linhagens	S9	Médias de Revertentes Espontâneos	Variação	
			Mínima	Máxima
TA97	-	114,25 ± 58,14	42	234
TA97	+	101,81 ± 63,63	41	288
TA98	-	19,57 ± 7,19	9	29
TA98	+	23,45 ± 8,73	9	40
TA100	-	96,09 ± 45,06	33	194
TA100	+	90,19 ± 39,80	31	179
TA102	-	166,58 ± 85,99	87	346
TA102	+	189,82 ± 72,57	72	313

Estes dados correspondem a 150 experimentos realizados consecutivamente no período de 25/09/91 a 15/05/92.